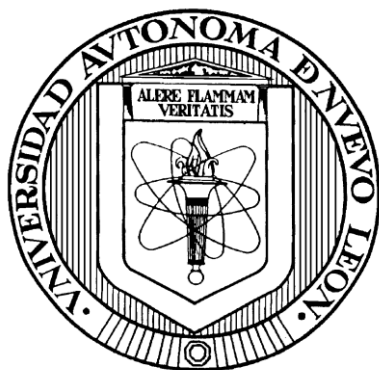


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS DE CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES HUMANAS ORIGINADAS EN TEJIDO  
ADIPOSO**

**PRESENTADO POR**

**Q.F.B SELENE JACOBO ARREOLA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE DE 2014**

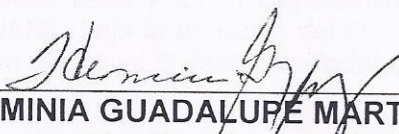
# DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS ORIGINADAS EN TEJIDO ADIPOSO

Aprobación de la tesis:



---

DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ  
Director de Tesis



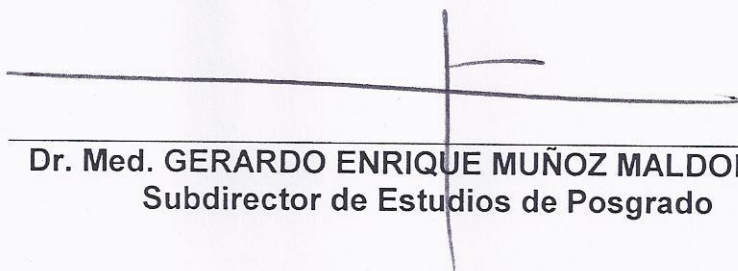
---

DR. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ  
Co-Directora de Tesis



---

DR. C RUBÉN GARCÍA GARZA  
Miembro de la Comisión de tesis



---

Dr. Med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO  
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección del Dr. Salvador L. Said y Fernández, la co-dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y del Dr. Rubén García Garza.

Este trabajo fue autorizado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro BI14-005.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme hacer realidad este sueño y por todo el amor con el que siempre me ha rodeado.

Al Dr. Salvador y la Dra. Herminia; por la oportunidad y confianza que depositaron en mí, por alentarme, por su interés, tiempo, conocimientos, disposición, dedicación y gran apoyo en todos los sentidos.

Al Dr. Rubén; por sus consejos, su permanente disposición, por compartir su conocimiento y experiencia para que las cosas salieran mejor.

A mis compañeros de laboratorio Nancy, Mario, Gysela, Jesús, Yesenia y Paulina por sus consejos, su apoyo, su ayuda en los experimentos, las pláticas y risas que compartimos y que hicieron del laboratorio mi segunda casa y a ustedes además de compañeros mis amigos.

A mis amigos y compañeros de generación Rolando, Guillermo, Brenda, Yazmín, Ulrich, Muza, Vanessa, Jesús, Mauricio, Byron, César, Abraham, Gysela, Nidia, por todas sus palabras de aliento cuando las cosas no iban bien, por su disposición a ayudarme siempre que lo necesite, por los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de la escuela, cada uno de ustedes hizo que esta fuera una etapa especial.

A Diego por siempre cuidarme, ayudarme y alegrarme con las tonterías que se nos ocurrían, no solo ahora sino a lo largo de estos 10 años de amistad. A Nora por tu cariño, amistad, ayuda, por hacerme sentir en casa. Los quiero mucho fueron un gran apoyo.

A Luis por todo tu apoyo, paciencia, comprensión y amor, me acompañaste siempre a la distancia, me animaste a seguir cuando sentía que no podía y me enseñaste a ser paciente. Aishimasu ☺

Al personal de Bioquímica Ariadna, Juany, Ruth, Daniel, Normita, Don Lalo y Angie por sus atenciones, ayuda, consejos y las agradables pláticas compartidas.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para realizar este posgrado.

## **DEDICATORIA**

Esta etapa ha sido de crecimiento personal, llena de trabajo arduo, sin sabores pero sobre todo de gran aprendizaje y no lo hubiera logrado sin el apoyo de mis seres queridos por eso este trabajo lo quiero dedicar a ellos.

Principalmente a mis padres Felipe y Selene con todo mi amor; por toda una vida de arduo trabajo, sacrificios, preocupaciones, consejos, comprensión, amor, para ayudarme a forjar mi camino, lograr mis sueños, objetivos y ser una mejor persona.

A mis hermanos Briseida, Felipe y Adalid con los que he compartido alegrías, tristezas, los he extrañado mucho pero han sido mi motivación e inspiración. A la nueva integrante de la familia, Darlene. Los quiero

A la memoria de mi tío Armando del que no pude despedirme pero que siempre he llevado en mi corazón.

## ÍNDICE

	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ii
	<b>ABREVIATURAS</b>	ii
	<b>RESUMEN</b>	1
I	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
I.1	GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	2
I.1.1	Estructura macroscópica del sistema nervioso central	2
I.1.2	Estructura macroscópica de la médula espinal	3
I.1.3	La neurona.	3
I.2.	SNC Y MIELINA	4
I.2.1	Oligodendrocitos	6
I.3	LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL	8
I.3.1	Patofisiología de la lesión de médula espinal	8
I.3.2	Importancia epidemiológica de la lesión de médula espinal	9
I.4	CÉLULAS MADRE	10
I.4.1	Células Madre Mesenquimales	11
I.4.2	CMM de tejido adiposo	12
II	<b>ANTECEDENTES</b>	14
II.1	TERAPIA DE LAS LESIONES DE MÉDULA ESPINAL	14
II.2	TERAPIA CON OLIGODENDROCITOS DE LESIONES DEL SNC EN ANIMALES	15
II.3	DIFERENCIACIÓN DE CMM A OLIGODENDROCITOS	16
II.4	CULTIVO DE CÉLULAS EN TRES DIMENSIONES (3D)	17
II.5	COCULTIVO	17
III	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	19
IV	<b>EL PROBLEMA</b>	19
V	<b>HIPÓTESIS</b>	19
VI	<b>OBJETIVOS</b>	20
VI.1	OBJETIVO GENERAL	20
VI.2	OBJETIVOS PARTICULARES	20
VII	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	21
VII.1	CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DE TEJIDO ADIPOSO	21
VII.1.1	Aislamiento de CMMH-TA	21

VII.1.2	1.2 Cultivo y expansión de CMMH-TA	21
VII.1.3	1.3 Caracterización mediante inmunocitoquímica	22
VII.2	DIFERENCIACIÓN DE CMMH-TA	23
VII.2.1	Preinducción	23
VII.2.2	Inducción	24
VII.2.3.	Cultivo en 3D	24
VII.2.4	Co cultivo	25
VII.3	CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS INDUCIDAS A OLIGODENDROCITOS	25
VII.3.1	Inmunocitoquímica	25
VII.3.2	RT-PCR	26
VII.3.3	Extracción de ARN	26
VII.3.3.1	Extracción de ARN cerebro humano	26
VII.3.3.2	Extracción de ARN CMMH-TA y células inducidas	27
VII.3.4	RT-PCR	27
VII.3.5	RT-PCR tiempo real	29
VII.4	ANÁLISIS DE DATOS	30
VII.4.1	Caracterización mediante inmunocitoquímica	30
VII.4.2	RT-PCR	30
VII.4.3	RT-PCR tiempo real	30
VIII	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>	30
IX	<b>RESULTADOS</b>	32
IX.1	CMMH-TA	32
IX.1.1	Aislamiento y caracterización de CMMH-TA	32
IX.2	DIFERENCIACIÓN	33
IX.2.1	Diferenciación de CMMH-TA a oligodendrocitos	33
IX.2.2	Diferenciación de CMMH-TA a oligodendrocitos en cultivos 3D	33
IX.2.3	Cocultivo	34
IX.3	CARACTERIZACIÓN DE CMMH-I	35
IX.3.1	Inmunocitoquímica de CMMH-I	35
IX.3.2	Inmunocitoquímica de cocultivo	40
IX.4.	RT-PCR y qRT-PCR	41
IX.4.1	Obtención de ARN	41
IX.4.2	Calidad del material genético de cerebro humano	41
IX.4.3	Cuantificación de la expresión de los genes específicos de oligodendrocitos	41

IX.4.4	Cuantificación de la expresión de MBP y PLP	45
X	<b>DISCUSIÓN</b>	46
X.1	Ventajas del TA como fuente de CMMA para diferenciarlas a oligodendrocitos	46
X.2	Principales modificaciones al protocolo original de diferenciación	46
X.3	Adopción, CMMH-TA inducidas de una morfología típica de oligodendrocitos	47
X.4	Expresión de marcadores a nivel de traducción	47
X.5	Expresión de marcadores a nivel de transcripción	49
X.6	Ausencia de expresión de Olig2, NG2, O4 y MOG	49
X.7	Expresión de marcadores neurales por CMM	50
X.8	Expresión génica por oligodendrocitos-like derivados de CMMH-TA cultivados en 3D y en cocultivo con neuronas	51
X.9	Interpretación de nuestros resultados en contextos con el conocimiento actual	52
X.10	Aportaciones al conocimiento de la diferenciación de CMMH-TA	53
XI	<b>CONCLUSIONES</b>	55
XII	<b>PERSPECTIVAS</b>	55
XIII	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	56



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Esquema del sistema nervioso central	2
Figura 2.	Esquema del corte transversal de la médula espinal	3
Figura 3.	Esquema de la médula espinal y meninges	4
Figura 4.	Estructura de las neuronas y redes neuronales	4
Figura 5.	Representación espacial de los lípidos y proteínas de la mielina	5
Figura 6.	Región cervical de la columna vertebral	10
Figura 7.	Caracterización de CMMH-TA por ICQ	32
Figura 8.	Microfotografías de cultivos en monocapa	33
Figura 9.	Microfotografías de cultivos en Matrigel	34
Figura 10.	Microfotografías de cocultivo	35
Figura 11.	Estandarización de la técnica ICQ para anti-MBP	36
Figura 12.	Estandarización de la técnica ICQ para anti-PLP	37
Figura 13.	Caracterización ICQ de las células inducidas a diferenciación con anti- MBP	38
Figura 14.	Caracterización ICQ de las células inducidas a diferenciación con anti- PLP	39
Figura 15.	Control de la técnica de ICQ	39
Figura 16.	Caracterización por ICQ del cocultivo con anti- MBP	40
Figura 17.	Caracterización por ICQ del cocultivo con anti- PLP	41
Figura 18.	Patrón de bandeo del ARN	42
Figura 19.	Estandarización de la PCR	43
Figura 20.	Ensayos de PCR de células inducidas a diferenciación y células control	43
Figura 21.	Gráfico de la expresión relativa del gen Nestina	44
Figura 22.	Gráfico de la expresión relativa de los genes CNPasa y PDGFR- $\alpha$	44
Figura 23.	Gráfico de la Expresión relativa de los genes MBP y PLP	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones para la síntesis de cDNA	28
Tabla 2.	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	28
Tabla 3.	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR tiempo real	29

## ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ATRA	ácido todo trans-retinoico
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos b
°C	grados centígrados
CM	células madre
CME	células madre embrionarias
CMM	células madre mesenquimales
CMM-MO	células madre mesenquimales de médula ósea
CMN	células madre neurales
CMMH-TA	células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo
CMMH-I	células madre mesenquimales humanas inducidas
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CNPasa	2'3'-nucleótido-cíclico 3'fosfodiesterasa
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DAB	3-3' - diaminobenzidina
DMEM	dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfoxido
GalC	galactocerebrósido
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
H <sub>2</sub> O	agua
h	hora
HRP	peroxidasa de rábano

HRG	Heregulina
ICQ	Inmunocitoquímica
LME	lesión de médula espinal
MAG	glicoproteína asociada a la mielina
MBP	proteína básica de la mielina
MOG	glicoproteína de mielina de oligodendrocitos
min	Minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
ng	nanogramos
NG2	proteoglicano condroitin-sulfato
Olig2	factor de transcripción de oligodendrocitos
OPC	células precursoras de oligodendrocitos
pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-AA	factor de crecimiento derivado de plaquetas AA
PLP	proteína proteolípida
RT-PCR	transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SBF	suero bovino fetal
SNC	sistema nervioso central
Shh	sonic hedgehog
TA	temperatura ambiente
TBST	solución buffer tris salino con tween 20
TRS	solución recuperadora de antígenos
T3	Triyodotironina
µg	microgramo
µL	microlitro
µM	micromolar

## RESUMEN.

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina.  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Presenta: Q.F.B Selene Jacobo Arreola

### DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS ORIGINADAS EN TEJIDO ADIPOSO.

**Introducción.** El organismo es incapaz de recuperarse por sí sólo de lesiones de médula espinal (LME), debido a la pérdida de células, degeneración de axones, neuroinflamación y gliosis reactiva. La mielina, producida por los oligodendrocitos, protege a los axones de la degeneración. Una alternativa para inducir la recuperación de funciones de la médula espinal es implantar, en el sitio de la LME, oligodendrocitos derivados de células madre mesenquimales humanas (CMMH). El tejido adiposo es el más rico en CMMH (CMMH-TA) y su obtención es poco invasiva. **Justificación.** A pesar del potencial terapéutico de las CMMH-TA en la LME, hasta ahora, no se conocía su capacidad para diferenciarse *in vitro* a oligodendrocitos. **Hipótesis.** Bajo condiciones adecuadas de cultivo, las CMMH-TA son capaces de diferenciarse a oligodendrocitos. **Objetivo.** Obtener y caracterizar oligodendrocitos derivados de CMMH-TA. **Material y Métodos.** Cultivos de CMMH-TA estando en su cuarto pase, se indujeron por 9 d, para diferenciarse a oligodendrocitos, en un medio y bajo condiciones *ad hoc*. La pertenencia a la estirpe de oligodendrocitos de las células inducidas se certificó mediante inmunocitoquímica, con anticuerpos monoclonales anti-proteína básica de la mielina (anti-MBP) y anti-proteína proteolipídica (anti-PLP), además, analizamos la expresión de marcadores específicos de linaje oligodendrocítico (nestina, Olig2, CNPasa, MOG, NG2, O4 y GAPDH, MBP y PLP) mediante RT-PCR o qRT-PCR. Debido a que las CMM se desarrollan y se expresan mejor algunos marcadores de oligodendrocitos en cultivos de tres dimensiones (3D) y en presencia de neuronas, indujimos CMMH-TA a diferenciarse a oligodendrocitos en Matrigel®, así como en cocultivo de neuronas hipotalámicas de ratón (mHypoA-61). **Resultados.** Las CMMH-TA inducidas (CMMH-I) cambiaron su morfología de fusiforme a la de oligodendrocitos, con un cuerpo central y largas y múltiples prolongaciones. El 13.36%  $\pm$  7.25% y 15.37%  $\pm$  7.73% de las CMMH-I expresó PLP y MBP, respectivamente y su expresión de nestina, PDGFR- $\alpha$ , CNPasa aumentó 0.8 veces. Además, la expresión de MBP y PLP aumentó 14 y 8 veces, respectivamente ( $p < 0.05$ ) con respecto a la de las CMMH-TA, lo cual es congruente con nuestros resultados de inmunocitoquímica. Sin embargo, las CMMH-TA no expresaron los genes MOG, NG2, O4 y Olig2, bajo ninguna forma de cultivo. **Conclusiones y discusión.** Las CMMH-I adquirieron el genotipo y fenotipo de oligodendrocitos, sin embargo por razones que desconocemos las CMMH-I no expresaron MOG, NG2, O4 y Olig2 en nuestras condiciones. Nuestros resultados confirman nuestra hipótesis y sugieren que las CMMH-TA inducidas, son aptas para probarse en ensayos *in vivo* de sustitución celular para tratar LME.

---

Dr. C. Salvador L. Said y Fernández  
Director de Tesis

---

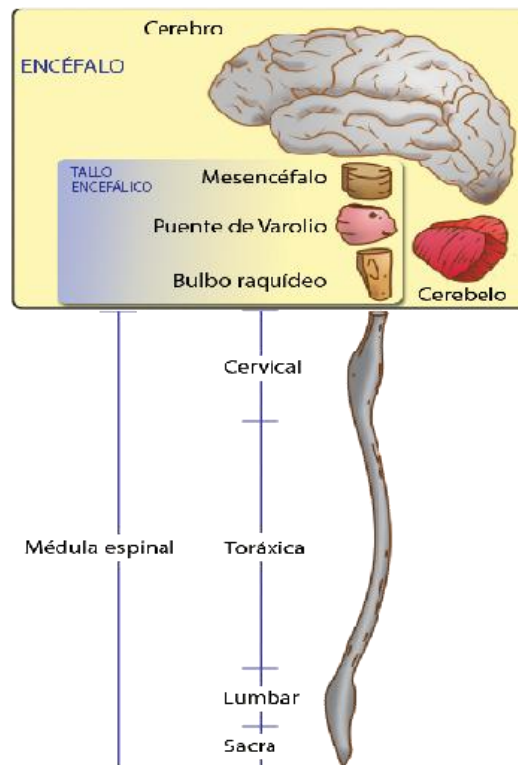
Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Co-Directora de Tesis

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

**I.1.1 Estructura macroscópica del sistema nervioso central.** La Fig. 1 (Pág. 1) muestra que el sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y la médula espinal [1].

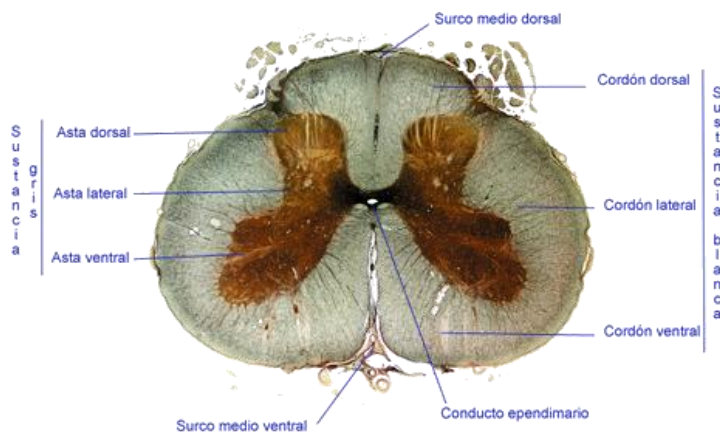
El encéfalo se encuentra dentro del cráneo; la médula espinal se ubica en el conducto raquídeo, extendiéndose desde el agujero occipital hasta la segunda vértebra lumbar [1].



**Figura 1. Esquema del sistema nervioso central (SNC).** El SNC consiste en el encéfalo formado por el cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo y la médula espinal. Tomado de [http://es.wikipedia.org/wiki/Sistema\\_nervioso\\_central](http://es.wikipedia.org/wiki/Sistema_nervioso_central).

**I.1.2 Estructura macroscópica de la médula espinal.** La Fig. 2 (Pág. 3) es una representación de un corte transversal de la médula espinal. En el centro de la médula espinal se localiza el conducto ependimario, alrededor del cual se ubica la sustancia gris dispuesta en forma de alas de mariposa, en la parte ventral de la sustancia gris están los cuerpos de las neuronas motoras y en la parte dorsal se localizan los cuerpos de las neuronas sensitivas.

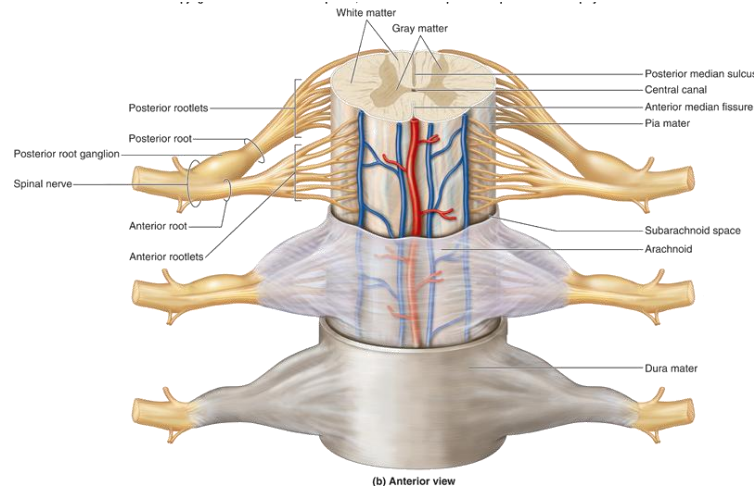
Alrededor de la sustancia gris está la sustancia blanca, formada por fibras nerviosas, llamadas axones. [2].



**Figura 2. Esquema del corte transversal de la médula espinal.** En el esquema se muestran las estructuras internas de la médula espinal, que incluyen la sustancia blanca, sustancia gris y conducto epidimario. Tomado de <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/anatocom/Biologia/Los%20Sistemas/Nervioso/Central/Medula.htm>.

La médula espinal está protegida por tres capas de tejido conectivo llamadas meninges, las cuales son: duramadre, aracnoides y piamadre (Fig. 3, Pág. 4).

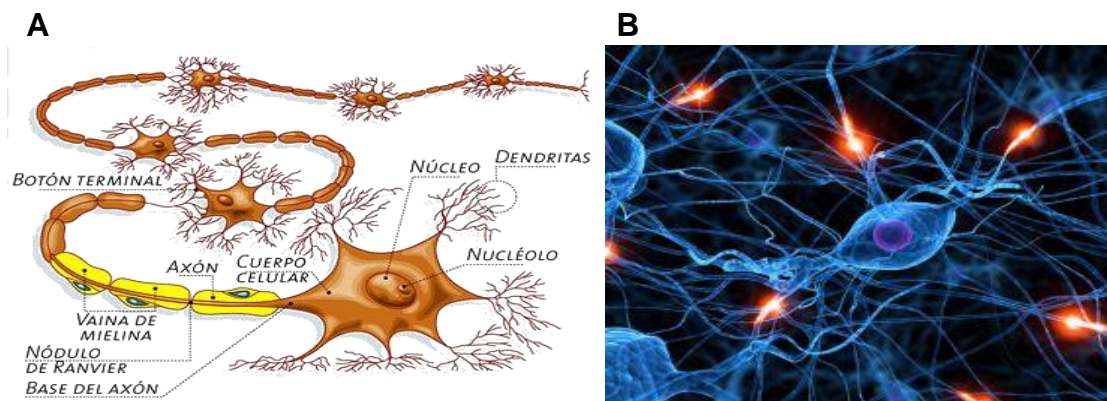
**I.1.3 La neurona.** Es la unidad anatómica y funcional del sistema nervioso, está formada por un cuerpo central rodeado por conjuntos de pequeñas terminales delgadas (dendritas) y una extensión llamada axón (Figura 4A, Pág. 4) [2].



**Figura 3. Esquema de la médula espinal y meninges.** La imagen muestra el corte transversal de la médula espinal en donde se observa la localización de las meninges que son las membranas que protegen a la médula espinal. Tomado de <http://lamedulaespinal.wikispaces.com/2.+CONFIGURACI%C3%93N+DE+LA+M.+E.>

## I.2 SNC Y MIELINA

Las neuronas constituyen el componente más importante del SNC; éstas se conectan entre sí para formar una intrincada red que conduce impulsos eléctricos (Fig. 4B, Pág. 4). La sustancia blanca está compuesta por las fibras nerviosas (axones) cubiertos por mielina. La mielina es una estructura especializada, generada por las células gliales, que aísla los axones neuronales, permitiendo una conducción rápida de los impulsos eléctricos.

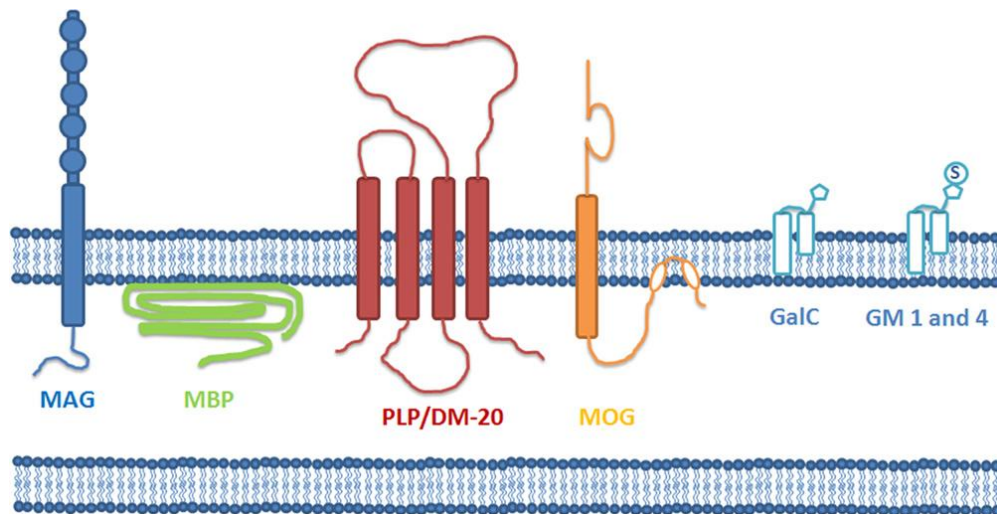


**Figura 4. Estructura de las neuronas y redes neuronales.** El recuadro izquierdo ilustra la estructura de una neurona y el recuadro derecho representa a una red neuronal. Tomado de [http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/3\\_neurohistologia\\_archivos/Page324.htm](http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/3_neurohistologia_archivos/Page324.htm)

La mielina compacta consiste en una membrana condensada, enrollada alrededor de los axones que forma la vaina aislante segmentada, necesaria en la conducción axonal saltatoria [3].

La mielina contiene 70% de lípidos y 30% de proteínas, esta composición le da las propiedades de aislamiento que son esenciales para la rápida conducción nerviosa. Uno de los lípidos más abundantes e importantes para el funcionamiento de las redes neuronales de la mielina es el galactocerebrósido (GalC) que forma casi el 20% del peso seco de los lípidos de la mielina. Otros lípidos principales presentes son derivados sialilados de GalC, que son el gangliósido GM1 y GM4 [4].

Las principales proteínas presentes en la mielina son, la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolipídica (PLP); que representan el 80% de las proteínas totales de la mielina. Además, algunas de las principales glicoproteínas de la mielina son: la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) (Fig. 5, Pág. 5) [4].



**Figura 5. Representación espacial de los lípidos y proteínas de la mielina.** MAG – Glicoproteína Asociada a la Mielina; MBP – Proteína Básica de la Mielina; PLP – Proteína proteolipídica; MOG – Glicoproteína de Mielina de oligodendrocitos; GalC – galactocerebrósido; gangliósido GM1 y GM4; La S en GM-1 y GM-4 se refiere al grupo sulfato. (Mekhail y col. 2012)



Los canales de sodio dependientes de voltaje, están localizados entre los segmentos de mielina, en los nodos de Ranvier, a partir de donde se propagan los potenciales de acción y se extienden a lo largo del segmento mielinizado, para enviar el potencial de acción al nodo siguiente. La mielinización permite a los nervios llevar a cabo los potenciales de acción más rápido y por distancias más largas. Además, la conducción saltatoria de los potenciales de acción de nodo a nodo reduce las necesidades metabólicas de las neuronas y aumenta la velocidad de conducción [5].

**I.2.1 Oligodendrocitos.** La función de los oligodendrocitos es la síntesis de mielina y la protección de los axones neuronales, envolviéndolos con múltiples capas de su membrana plasmática, muy rica en mielina. Esta función de los oligodendrocitos es crítica para maximizar y mantener la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos y la función apropiada del SNC. Un solo oligodendrocito puede ser el responsable de mielinizar hasta 50 axones [6]. Al igual que la mayoría de otras células en el SNC, los oligodendrocitos se generan a partir de células precursoras neurales pluripotentes del tubo neural, que a su vez derivan del ectodermo embrionario [7]. La estirpe oligodendrogial está compuesta por una serie de fenotipos celulares que va desde células madre (indiferenciadas) hasta células maduras formadoras de mielina. Se considera que las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) *in vivo* se originan y diferencian inicialmente en las zonas subventriculares de los ventrículos laterales del cerebro. Estas zonas contienen una población heterogénea de células progenitoras. La restricción del desarrollo de OPC a estas regiones depende de señales localizadas, positivas y negativas. Una de las señales positivas es la llamada Sonic hedgehog (Shh). Después de que han surgido en zonas germinales del cerebro y la médula espinal, los OPC migran a lo largo de la sustancia blanca en desarrollo, donde se dividen, en gran medida en respuesta a PDGF. Después dejan de migrar, se retiran del ciclo celular y se diferencian en oligodendrocitos mielinizantes, que expresan

galactocerebrósido. Se ha demostrado que las OPC tienen un temporizador intrínseco que regula cuando dejan de dividirse y diferenciarse, y por lo menos dos tipos de señales extracelulares parecen ser necesarias para que este temporizador funcione normalmente: PDGF y hormonas tiroideas [7]. PDGF-AA es un mitógeno esencial para la proliferación de OPC, su receptor PDGFR se limita a las OPC en el desarrollo y en el SNC adulto [8]. La activación del PDGFR quinasa induce la proliferación OPC mediante la estimulación de las vías MAP quinasa, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ). Además, PDGF promueve la proliferación de OPC por la activación de la integrina alfa 6 beta 3 ( $\alpha 6 \beta 3$ ) [6].

*In vitro*, numerosos mitógenos y factores tróficos promueven la proliferación, la maduración y la supervivencia de precursores de oligodendrocitos, como PDGF, bFGF, triyodotironina, progesterona, insulina, transferrina, entre otros. Los cambios morfológicos y la iniciación de la expresión de los genes de mielina se acompaña de un cambio transitorio en el perfil de antígenos: Los marcadores A2B5 y NG2 están vinculados a los precursores, O4 con oligodendrocitos inmaduros. Células maduras mielinizantes expresan secuencialmente GalC, PLP, MBP, MAG y finalmente MOG.

El desarrollo de los oligodendrocitos y la mielinización de los axones individuales es un proceso altamente regulado y controlado por varios mecanismos. Estos incluyen ligandos axonales de superficie, moléculas secretadas y actividad axonal [3] [9].

La desmielinización causada por una lesión o enfermedad como esclerosis múltiple, leucodistrofias, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, leucomalacia periventricular, parálisis cerebral, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, y enfermedad de Alexander; aunado al fallo de la regeneración de la mielina, interrumpe la rápida propagación de los potenciales de acción a lo largo de las fibras nerviosas y conduce a la degeneración axonal [10] [6].

### **I.3 LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL**

La lesión de médula espinal (LME) se define como la afección medular multifactorial que puede ser aguda o crónica, que afecta al individuo emocional, financiera, física y socialmente. Se caracteriza principalmente por alteraciones de la sensibilidad, la fuerza muscular y el control de esfínteres. [11] A menudo conduce a la pérdida permanente de funciones corporales que afectan la vejiga, intestinos, órganos reproductores, sistema somato-sensorial y movimiento de las extremidades [12] [13].

La gravedad de la lesión de la médula espinal se determina mediante una evaluación neurológica.

**I.3.1 Patofisiología de la lesión de médula espinal.** Cuando la médula espinal se daña, ocurren múltiples alteraciones en la anatomía y la fisiología de la médula espinal que afectan tanto a las neuronas como a las células gliales. Los estudios clínicos demuestran que los pacientes sufren de daño primario y secundario durante la fase aguda de la lesión. El daño primario es debido al impacto mecánico y consiste en una hemorragia en la médula espinal, que se produce en la materia gris, debido a la alta vascularización en esa región. La lesión luego se expande tanto en sentido horizontal en la materia blanca y rostro caudal en la materia gris, lo que provoca más degeneración neuronal. La lesión secundaria se lleva a cabo después del trauma inicial y consiste en la ampliación del daño neurológico debido a los cambios bioquímicos en el sitio de la lesión [4].

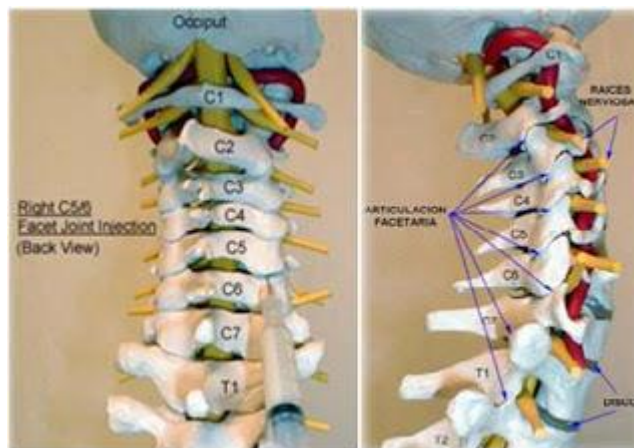
Después de haber sufrido la lesión, las alteraciones en las vías aferentes primarias con frecuencia dan lugar a la inducción de dolor neuropático, que aumenta el sufrimiento de los pacientes [14] [15]. Todos los nervios cuya ubicación es anterior a la lesión continúan funcionando normalmente, pero los posteriores a ella dejan de recibir las señales del cerebro; lo que produce disfunciones y parálisis de diversa magnitud en las

extremidades y órganos afectados. Por lo tanto, mientras más cerca del cerebro sea la lesión, mayor porcentaje del cuerpo queda paralizado [11].

Uno de los resultados patológicos de las lesiones, aguda y crónica, de la médula espinal es la desmielinización de los axones en el sitio de la lesión. Esto es debido a la muerte de los oligodendrocitos por necrosis o apoptosis. Al morir los oligodendrocitos, las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) son reclutadas al sitio de la lesión para remielinizar los axones desnudos. Sin embargo, la remielinización que se lleva a cabo después de la lesión es anormal, la mielina producida es generalmente más delgada.

**1.3.2 Importancia epidemiológica de la lesión de médula espinal.** Las lesiones de médula espinal son, en su mayoría, el resultado de golpes, compresión, desgarramiento o sección del tejido medular [2]. La causa número uno de lesiones en la médula espinal es el trauma. Entre las causas de trauma, destacan los accidentes automovilísticos 38.6%, caídas de altura 23.2%, heridas por arma de fuego 22.5%, deportivas 6.7% (clavados como primer lugar), también puede ser causada por infecciones (tuberculosis vertebral), tumores, enfermedades degenerativas (atrofia espinal) 1-5%. La edad de mayor incidencia es entre los 16 y 30 años, el 81.7% de los casos ocurren a personas del sexo masculino. La localización más frecuente de lesiones de la médula espinal es la región cervical (14.7%); a la altura de la quinta vértebra (C5) (Fig. 6, Pág. 10) [16].

Se estima que cada año sufren lesiones de la médula espinal 130 000 personas alrededor del mundo [12]. En 2005, se estimó que 2.5 millones de personas en todo el mundo vivían con parálisis inducida por LME. La tasa de lesiones de médula espinal en el ámbito mundial es de 15 a 40 casos por millón de habitantes [15].



**Figura 6. Región cervical de la columna vertebral.** Se muestra la región donde ocurren más frecuentemente las lesiones de médula espinal. Tomado de <http://xananatura.blogspot.mx/2011/10/vertebras-cervicales-dolor-cervical.html>

En México no existen estadísticas exactas sobre la incidencia y la prevalencia de lesiones de médula espinal, sin embargo, se estima que la tasa de incidencia, por año, es de 18.1 por millón de habitantes. Estos datos son similares a los que se presentan en todo el mundo, sin embargo, es difícil comparar los datos epidemiológicos de un país o de un continente a otro, debido a las diferencias en la estructura social, procedimientos terapéuticos y sistemas de recolección de datos [13] [11].

El amplio espectro de enfermedades del sistema nervioso central a tratar, su frecuencia y la falta de tratamientos efectivos, resulta en una necesidad urgente de opciones terapéuticas alternativas, tales como las terapias de reemplazo celular [17].

#### **I.4 CÉLULAS MADRE (CM)**

Las CM tienen la habilidad de auto-replicarse durante lapsos de tiempo muy grandes, sin perder sus propiedades biológicas nativas. Cuando así se requiere, las CM pueden diferenciarse en subtipos celulares especializados [18]. De acuerdo con su capacidad de diferenciación, las CM se clasifican como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes [19] [20]. De acuerdo con su procedencia las CM pueden dividirse en cuatro tipos principales: CM **embrionarias**; CM pluripotentes, derivadas de la masa

celular interna de un embrión en el estadio de blastocisto. Las CM embrionarias son capaces de dar lugar a células de las tres capas germinales dentro del cuerpo. Las CM **adultas** tienen un potencial más restringido de linaje, generalmente tienen la capacidad de repoblar su nicho dentro de los tejidos. Se ha visto que existen CM **cancerosas** que son responsables del crecimiento de los tumores. Si se cultiva por separado a las células madre cancerosas, éstas dan lugar a los tipos de células encontrados en el tumor. El último tipo de células madre son las CM **pluripotentes inducidas**. Estas células son creadas por reprogramación de células somáticas, ya sea por manipulación genética (transferencia nuclear) o por exposición a ciertos factores que revierten su estado diferenciado a otro con capacidad para diferenciarse en las tres capas germinales así como las células madre embrionarias [21].

Existen CM en un área específica de cada tejido al que se le llama “nicho de CM” y que sirve como reservorio a largo plazo de células quiescentes que pueden ser activadas para reparar tejidos u órganos ante ciertos estímulos [22]. Estas células contribuyen a mantener la homeostasis tisular mediante la sustitución de las células dañadas.

A pesar de que las CM embrionarias son generadoras de todos los tejidos y de que conservan su potencial de producir un organismo completo, funcional y normal, su uso terapéutico ha sido limitado debido a su posible tumorigenicidad, así como a las limitaciones de índole ético [23]. Ante estas dificultades, una excelente alternativa para desarrollar procedimientos de terapia celular consiste en la diferenciación, *in vivo* o *in vitro* con CM adultas y autólogas, las cuales son pluripotentes, no representan un peligro para los donantes/receptores de dichas células y no implican ningún problema ético [24].

**I.4.1 Células Madre Mesenquimales** El término Célula Madre Mesenquimal (CMM), fue acuñado por Caplan en 1991, y se refiere a células CMM derivadas de la médula espinal, aunque algunos autores utilizan "mesenquimales" para describir a una

categoría más amplia de CM adultas multipotentes que incluye a CM de tejido adiposo y células perivasculares de apoyo, o pericitos. Por primera vez, Friedenstein y col. [25] clasificaron como CMM a aquellas células, derivadas de médula ósea, que son capaces de adherirse al plástico, que exhiben una morfología similar a fibroblastos y que son inherentemente osteogénicas, además de funcionar como células de apoyo para otras células de la médula ósea. Posteriormente, se encontró que las CMM poseen la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de tejidos mesenquimales, incluyendo hueso, cartílago y músculo [26].

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), las células madre mesenquimales (CMM), independientemente de su origen, se definen por los siguientes criterios:

- 1.- Deben adherirse al plástico, bajo condiciones estándar de cultivo
- 2.- Deben expresar los siguientes marcadores —no específicos—: CD105, CD90 y CD73 y no deben expresar CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 MHC-II y HLA-DR.
- 3.- Deben ser multipotentes, es decir, deben tener la capacidad para diferenciarse en osteoblastos, adipocitos o condroblastos bajo estímulos específicos *in vitro* [27].

El hecho de que las CMM puedan diferenciarse en varios tipos celulares *in vitro*, de que puedan expandirse fácilmente en cultivo y de que no sean inmunogénicas, permiten que el trasplante alogénico de estas células sea viable; sin implicar un riesgo sustancial de rechazo inmunológico. Las CMM son una fuente muy abundante y prometedora de trasplantes alogénicos para reparar tejidos [28].

Las CMMH ofrecen la posibilidad de criopreservarlas por un largo tiempo, sin pérdida importante de su potencial terapéutico [29].

**1.4.2 CMM de tejido adiposo.** En 1976, se aislaron precursores adipogénicos de tejido adiposo humano (CMMH-TA) y en 2001, Zuk y Col., aislaron e identificaron CMMH-TA

de lipoaspirados. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos y una población heterogénea de células que rodea y soporta los adipocitos. La estructura de donde se obtienen las CMMH-TA se denomina fracción vascular estromal. Las CMMH-TA pueden obtenerse mediante procedimientos mínimamente invasivos [27] y tienen una enorme capacidad para ser inducidas a diferenciarse *in vitro* en una extensa variedad de estirpes celulares, como osteocitos, condrocitos; miocitos (cardiomiocitos, células de músculo liso y esquelético) [30].

Además, las CMMH-TA autólogas no son rechazadas por el sistema inmune y es posible evitar el uso de fármacos inmunosupresores. Por todas estas razones las CMMH-TA autólogas son actualmente muy apreciadas para ser utilizadas en medicina regenerativa, mediante el reemplazo de células y tejidos [31].



## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 TERAPIA DE LAS LESIONES DE MÉDULA ESPINAL**

La recuperación de la LME es difícil por la pérdida significativa de células, la degeneración de axones, la interrupción de las vías sensoriales y motoras, la pérdida de conexiones neuronales, la neuroinflamación, y la gliosis reactiva. Todos esos inconvenientes restringen severamente la plasticidad funcional de la médula [14].

En una LME, el uso de agentes neuroprotectores es el tratamiento inicial. Sobre todo, para evitar el deterioro y reabsorción de los axones; sin embargo, la forma más eficaz para proteger a los axones es inducir la remielinización, tan pronto como sea posible. Esto se podría lograr promoviendo la actividad mielinizante de las células progenitoras de oligodendrocitos endógenos (OPC) o por la implantación de células remielinizantes exógenas [32] [33].

Antes se pensaba que el único beneficio de la remielinización era la restauración de la conducción saltatoria; y por lo tanto, la restauración de la función perdida. Aunque esto sigue siendo importante, la remielinización también es importante en el mantenimiento de la integridad axonal. Esto se basa en evidencia que sugiere que el estrés metabólico de las neuronas que mantienen los axones se compensa, por el apoyo trófico local, a partir de células mielinizantes [34].

Las estrategias exitosas de recuperación para LME requieren tratamientos multifacéticos para atacar a los diversos mecanismos de lesión. La acumulación de evidencias en medicina regenerativa promete que la LME puede ser tratada a base de terapia celular con CMMH. Este enfoque terapéutico está en fase de desarrollo [14].

Los trasplantes celulares para el tratamiento de LME han sido objeto de numerosos estudios preclínicos en las últimas dos décadas. Varios tipos de células se han utilizado,

considerando su potencial para formar la mielina, promover y orientar el crecimiento axonal y restaurar la anatomía y función de las regiones lesionadas. Además de que las CMMH autólogas localizan el sitio lesionado, se implantan en él y proliferan (*homing*), se sabe ahora que las CMMH secretan factores tróficos, que pueden tener efectos neuroprotectores o promover la plasticidad en la médula espinal. Por lo tanto, los efectos benéficos de la terapia celular con CMMH son multifactoriales y, a menudo, difíciles de atribuir a un sólo mecanismo. El beneficio neurológico mostrado en modelos de roedores se considera como evidencia de que la terapia celular tiene potencial terapéutico en LME en humanos; sin embargo, la mayoría de estos estudios emplean células de ratón; que por ahora, no es factible implantar en seres humanos. Así como el número de estudios en los que las células humanas han sido puestas a prueba en modelos de roedores es notablemente bajo [35] [4].

Se han utilizado varias fuentes de CM o células precursoras para derivar de ellas células formadoras de mielina. Algunas de estas fuentes son CME, células epiteliales olfativas humanas, CMM de fetos humanos, CMM pluripotentes adultas [36] [37], células precursoras neurales adultas, células precursoras gliales, células de Schwann, CM derivadas de médula ósea [37] [10], CM de cordón umbilical [38] y CM embrionarias diferenciadas a células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) [39] [36]. Cada uno de estos tipos de células tiene diferentes propiedades y la razón para el trasplante difiere ampliamente incluyendo neuroprotección, reemplazo celular o remielinización [12].

## **II.2 TERAPIA CON OLIGODENDROCITOS DE LESIONES DEL SNC EN ANIMALES.**

En modelos animales, el trasplante de células progenitoras de oligodendrocitos, efectivamente remieliniza el cerebro y la médula espinal [39]. Los tipos de células trasplantados incluyen CS, células gliales olfatorias, CME, CMN, precursores gliales,

CMM-MO. Los beneficios han sido mielinización de los axones, regeneración axonal, activación de las células endógenas, crecimiento axonal, mejora en la actividad locomotora [35] . A pesar de los avances en el trasplante celular, el tratamiento de la médula espinal en seres humanos sigue siendo un reto importante.

### **II.3 DIFERENCIACIÓN DE CMM A OLIGODENDROCITOS.**

El trasplante de células progenitoras de oligodendrocitos asegura su diferenciación a oligodendrocitos formadores de mielina; contribuyendo de manera eficiente a la remielinización del SNC, la atenuación de los procesos inflamatorios locales, la movilización de las células madre endógenas y el soporte trófico proporcionado por las células progenitoras de oligodendrocitos, son los beneficios adicionales de las células de reemplazo, promoviendo una eficaz neuroreparación [17].

La diferenciación de las CM al linaje de oligodendrocitos se ha logrado hasta ahora con el uso de diferentes fuentes celulares [10].

Los estudios para diferenciar CMM *in vitro* al linaje neuronal han utilizado diferentes enfoques. Algunos han utilizado reactivos relativamente simples; otros utilizan una mezcla de factores de crecimiento y otros tienen estrategias más elaboradas, que implican la expresión de transgenes específicos o cocultivos. La transdiferenciación de CM a oligodendrocitos ha sido demostrada por varios autores [40] [41] [39] [42] [32] [10] [37] [36] [43] [44]. Por ejemplo, Kennea y col., en 2009 y Zhang y Col. en 2010, obtuvieron oligodendrocitos a partir de CMMB y CMMH fetales, respectivamente.

La ventaja de manipular a las CMM *in vitro*, consiste en que la prediferenciación de CMM en tipos de células neuronales más restringidas, podría mejorar su capacidad de integrarse anatómica y funcionalmente en el cerebro o en la médula espinal; presumiblemente con mayor eficacia en lesiones. Además, se acepta que las células neuronales diferenciadas tienen una menor probabilidad de transformación maligna, en comparación a las células precursoras, que se dividen activamente [4].

## II.4 CULTIVO DE CÉLULAS EN TRES DIMENSIONES (3D)

El cultivo celular en 3D, se está convirtiendo en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular, constituye un paso imprescindible en campos como la ingeniería tisular y medicina regenerativa. La importancia del cultivo tridimensional reside en que las células se encuentran en un sistema que mantiene la integridad de un órgano, de forma que las interacciones entre células están garantizadas. Las células cultivadas en ambientes 3D muestran diferencias en metabolismo, diferenciación, expresión de genes y proteínas, proliferación, viabilidad y respuesta a diferentes estímulos, en comparación con las células cultivadas en ambientes 2D. Se pueden clasificar los cultivos tridimensionales en primarios, cuando el fragmento que se cultiva procede directamente, sin modificación de un organismo pluricelular y secundarios, cuando se parte de células que ya han sido cultivadas previamente y son reorganizadas sobre una malla tridimensional que sirve de estroma.

Dos de las tecnologías utilizadas actualmente en el cultivo de células en 3D son esponjas y microportadores. Las esponjas son geles, los geles que se utilizan comúnmente son colágeno, gelatina y laminina. Los poros que forman estos geles actúan como microambientes celulares. Además, utilizan moléculas purificadas y biopolímeros para recrear señales *in vivo* en las células. En el mercado podemos encontrar diferentes empresas especializadas en la fabricación de geles y esponjas, por ejemplo: Matrigel (Marca registrada por BD Biosciences, extracel TM de Biociencias, Glycosan y AlgiMatrix Marca registrada de Invitrogen).

Los microportadores, son pequeñas esferas. Normalmente su diámetro no supera los 500  $\mu$ [45].

## II.5 COCULTIVO

Un cocultivo es el crecimiento de más de un tipo celular en un cultivo. Los cocultivos son útiles para modelar y estudiar la interacción y señalización entre diferentes tipos de

células. Los cocultivos se pueden emplear para controlar la comunicación intercelular, la dinámica de la migración celular, la estimulación y el mantenimiento de la función celular y la diferenciación.

La comprensión de las complejas interacciones entre diferentes tipos de células en el SNC es importante para dilucidar cómo funciona, así como para el desarrollo de enfoques terapéuticos para combatir enfermedades. El cultivo de neuronas y células gliales juntos, permite la comunicación bidireccional entre estas células a estudiar [46].

### III. JUSTIFICACIÓN

El SNC es incapaz de recuperarse de lesiones traumáticas por sí solo. Por otro lado, las CMM pueden incorporarse a zonas lesionadas, diferenciarse a linajes neuronales revertir el proceso de degeneración y reparar el daño anatómico y funcional. Entonces, es necesario enfocar nuestros esfuerzos para conocer y utilizar mejor las fuentes de células precursoras de células diferenciadas del tejido nervioso. Una de las fuentes más ricas de CMMH es el tejido adiposo; pero hay poca experiencia sobre el uso terapéutico de células neuronales derivadas de CMMH-TA. Para aprovechar el potencial terapéutico de estas células, es indispensable desarrollar y caracterizar un modelo de diferenciación *in vitro* a oligodendrocitos, lo cual es un pre-requisito para el desarrollo de terapias celulares para tratar LME.

### IV. EL PROBLEMA

Investigar si es posible inducir CMMH-TA a diferenciarse en oligodendrocitos.

### V. HIPÓTESIS

Las CMMH-TA son capaces de diferenciarse a oligodendrocitos *in vitro*, utilizando los factores y las condiciones de incubación adecuados de diferenciación.

## **VI. OBJETIVOS**

### **V.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener oligodendrocitos derivados de CMMH-TA

### **V.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

V.2.1 Inducir *in vitro* CMMH-TA a diferenciarse en oligodendrocitos, en monocapa y en tercera dimensión (3D), en medio suplementado con factores de diferenciación en cultivos puros o en co-cultivo con neuronas.

V.2.2. Analizar, mediante inmunocitoquímica, la expresión de marcadores de superficie, específicos del linaje oligodendrocítico de las células inducidas, derivadas de CMMH-TA

V.2.3. Analizar la expresión génica relativa de exones específicos de linaje oligodendrocítico de las células inducidas, con respecto a las no inducidas, mediante RT-PCR o RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR).

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### VII.1 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DE TEJIDO ADIPOSEO (CMMH-TA)

**VII.1.1 Aislamiento de CMMH-TA.** El lipoaspirado (35 mL) de desecho de una persona adulta y sana, que se sometió a cirugía plástica y que donó voluntariamente la muestra, se incubó con 5 mL de una solución (200UI/mL) de colagenasa I (Sigma-Aldrich de México) a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 1 h. La muestra se homogenizó con una pipeta pasteur y se separaron las células de los detritus del tejido y células adiposas mediante centrifugación a 1000 × g por 15 min a 21°C y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces, resuspendiéndolas en 2 ml de solución salina isotónica de fosfatos, pH 7.4 (PBS) y centrifugándolas a 1000 × g por 15 min. Las células se resuspendieron en 2 mL de medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma-Aldrich de México) suplementado con 10% de suero fetal bovino ([SFB] v/v), 2.5 µg/ml de anfotericina B y 100 µg/ml de gentamicina (p/v). A este medio le llamaremos en adelante medio completo. Se sembraron las células en botellas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> con tapón permeable a los gases (CORNING®- Corning Incorporated, Corning, NY, USA) conteniendo 5 mL de DMEM/F12. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Las células no adheridas y el medio usado se transfirieron a una botella nueva. A la botella original, conteniendo las células adheridas se le agregaron 5 mL de medio completo fresco. Ambas botellas se incubaron. Este procedimiento se repitió una vez más. Las células adheridas al sustrato de las tres cajas (CMMH-TA) se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C hasta que las CMM-TA alcanzaron un 80% de confluencia.

**VII.1.2 Cultivo y expansión de CMMH-TA.** Al alcanzar una confluencia de 80% a las cajas de cultivo primario de 25 cm<sup>2</sup> se les adicionó 1 mL de tripsina al 0.25% en PBS y



se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 5 min. Las células se colocaron en un tubo de 15 mL y se les agregó 1 mL de medio completo se sedimentaron a 4,000 × g. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio fresco completo y la suspensión celular se dividió en dos alícuotas. Cada alícuota se colocó en dos botellas de 25 cm<sup>2</sup> nuevas: se completó el volumen de las botellas a 5 mL con medio fresco completo y las botellas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Cada tercer día, el medio de cultivo usado se reemplazó por un volumen igual de medio completo fresco. Cuando las monocapas de CMMH-TA alcanzaron una confluencia de 80%, se sembraron las células.

**VII.1.3 Caracterización mediante Inmunocitoquímica.** Se sembraron las CMMH-TA en microcámara de cultivo (Chamber Slide System), colocando 80 × 10<sup>3</sup> células en cada pocillo, se incubaron las preparaciones a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta que alcanzaron 80% de confluencia. Estas células se lavaron suavemente con PBS, se fijaron por 20 min a 4°C con metanol-acetona (1:1 v/v) y se lavaron de nuevo con PBS. Las células se marcaron con el Ac monoclonal anti-CD105 (Abcam, Cambridge, MA., USA). Se siguió el siguiente protocolo, a la microcámara se le agregó 300 µL de TBST y se incubó la preparación a 25 °C por 5 min. A continuación la microcámara se incubó con 150 µL de peróxido de hidrógeno al 3% a TA por 10 min para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Después la microcámara se lavó con TBST por 5 min y se agregó el reactivo para bloquear proteínas, incluido en el kit, a continuación se incubó la preparación por 30 min a 37°C. Se le añadieron 100 µL del Ac monoclonal primario anti-MBP diluido 1:100 con diluyente para anticuerpos (DakoCytomation antibody Diluent with Reducing Components) y se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4°C o 45 min a 37°C. Se lavó dos veces la preparación con TBST por 5 min; se le agregaron 100 µL de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano y se incubó por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó la preparación con TBST por 5

min, se añadió la solución de estreptavidina-HRP y se incubó por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con TBST por 5 min y se reveló con DAB por 10 min, DAB se preparó 1 gota de cromógeno y 20 gotas de sustrato. Después se lavó la preparación tres veces con agua destilada por 2 min. Los núcleos celulares se contrastaron incubando las preparaciones con hematoxilina por 1 min; se enjuagó con agua destilada y se deshidrataron las células incubándolas sucesivamente, por 1 min en etanol al 96% (dos veces), etanol absoluto (dos veces), xilol-etanol (1:1) y xilol 100% (dos veces). Las preparaciones se montaron con Entellan y se colocó un cubreobjetos sobre ellas. Como testigo positivo se utilizaron cortes de hígado humano, como testigo negativo cortes de yeyuno y como control de la técnica CMMH-TA a las que no se les agregó el anticuerpo primario anti-CD-105. Previo al marcaje, los tejidos que se usaron como controles se hidrataron con etanol al 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST. Cada paso de hidratación duró 3 min y se realizó a temperatura ambiente. Para la exposición de los antígenos se utilizó una solución de TRS (Target Retrieval Solution 1X de Dako) por 1 h a 90 °C. Para posteriormente realizar el marcaje con el anticuerpo previamente descrito.

## **VII.2 DIFERENCIACIÓN DE CMMH-TA**

El proceso de diferenciación se llevó a cabo en dos etapas, preinducción e inducción, de acuerdo con el método descrito por Abbaszadeh y col. [37].

**VII.2.1 Preinducción.** Las CMMH-TA se sembraron en una microcámara de cultivo (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Thermo Scientific, NY, USA), colocando 10,000 células/cm<sup>2</sup> en cada uno de los cuatro pocillos de la microcámara. Además se sembraron 50,000 células en placas petri de 35 mm x 10 mm (Corning, NY, USA) para llevar a cabo el proceso de diferenciación. Se preparó un medio que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) al 2% (SIGMA, St. Louis, MO, USA) disuelto en medio DMEM/F12 (GIBCO®-BRL, Grand Island, NY, USA) sin suero bovino fetal

bovino (SBF) (GIBCO®-BRL, Grand Island, NY, USA), con 2.5 µg/ml de anfotericina D, 100 µg/ml de gentamicina (p/v). A cada pocillo de la microcámara se le agregó 500 µL y a las placas petri 1.5 mL, del medio preparado. Las preparaciones se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 24 h. El medio con DMSO se cambió al siguiente día por DMEM/F12 (GIBCO ®-BRL) con 15% SBF y 1 µM de ácido all-transretinoico (ATRA) (Calbiochem®, © Merck KGaA Darmstadt, Alemania) y las microcámaras se reincubaron por 72 h bajo las mismas condiciones anteriores.

**VII.2.2 Inducción.** Se retiró el medio preinductor de las microcámaras y de las placas, éstas se lavaron con PBS. Las células se incubaron por 48 h en medio DMEM/F12 adicionado con 5 ng/mL de PDGF-AA, 10 ng/mL de bFGF y 200 ng/mL de HRG (PREPOTEC, INC., Rocky Hill, NJ, USA) por dos días, a continuación se hizo la inducción con 35 ng/mL de T3 (Sigma-Aldrich) además de los factores antes adicionados (medio de inducción), las células se incubaron en este medio por dos días.

**VII.2.3 Cultivo en 3D.** Una vez que pasaron los días de preinducción y dos días de inducción, las células inducidas a diferenciación, se desprendieron del sustrato con 1 mL de tripsina (GIBCO) al 0.25% se colocaron en un tubo de 15 mL y se les agregó 1 mL de medio inductor. Las células se sedimentaron a 4000 x g por 5 min. El pellet celular se resuspendió en medio de inducción y Matrigel en una relación 1:4. La mezcla de medio de inducción y Matrigel se colocó en uno de los 24 pozos de una placa de cultivo (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Adicionalmente, se sembraron CMMH-TA sin inducir, que fueron el grupo control. Durante todo el procedimiento arriba descrito, el Matrigel se mantuvo sumergido en hielo, y se trabajó rápidamente, una vez que se mezcló este material con las células. Se tomaron todas estas precauciones debido a que el Matrigel se solidifica a temperatura ambiente y fue necesario que la mezcla de células con este andamio tridimensional se solidificara de manera homogénea en el pozo. El cultivo en 3D se mantuvo en incubación a 37°C en

atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 3 días. Después, se liberaron las células del Matrigel con una solución (200UI/mL) de colagenasa I (Sigma-Aldrich) para romper la malla de proteínas e incubando el cultivo a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 h ayudando mecánicamente con una pipeta.

**VII.2.4 Cocultivo.** Se sembraron 80 000 células inducidas a diferenciación en cajas petri de 35 mm x 10mm (Corning, NY, USA) y 20 000 células en microcámaras (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Thermo Scientific) en medio de inducción, al día siguiente se les agregó la línea celular mHypoA-61 (Línea de neuronas hipotalámicas de ratón) en una proporción 1:10 y el medio se cambió por DMEM alto en glucosa suplementado con los factores mencionados anteriormente para preparar el medio de inducción. El cocultivo se dejó por 8 días cambiando el medio cada tercer día y después de este tiempo se realizó extracción de ARN e inmunocitoquímica al cocultivo.

### **VII.3 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS INDUCIDAS PARA DIFERENCIARSE A OLIGODENDROCITOS**

**VII.3.1 Inmunocitoquímica.** Este ensayo se realizó con CMMH-TA que son el grupo control y células en etapa de inducción que se sembraron en las microcámaras de cultivo, estas células se lavaron suavemente con PBS, se fijaron por 20 min a 4°C con metanol-acetona (1:1 v/v) y se lavaron de nuevo con PBS. Las células se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-PLP (Proteína lipoproteica) (Abcam, Cambridge, MA., USA) y anti-MBP (Proteína Básica de Mielina) (Abcam, Cambridge, MA., USA). Se siguió el protocolo descrito en la sección 1.3 (Pág. 19), utilizando en esta ocasión como testigos positivo y negativo cortes de cerebro humano de sustancia blanca y de sustancia gris, respectivamente y como control de la técnica, CMMH-TA a las que no se les agregó el anticuerpo primario. Previo al marcaje, los tejidos que se usaron como

controles se hidrataron con etanol al 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST. Cada paso de hidratación duró 3 min y se realizó a temperatura ambiente. Para la exposición de los antígenos se utilizó una solución de TRS (Target Retrieval Solution 1X de Dako) por 1 h a 90 °C. Para posteriormente realizar el marcaje con el anticuerpo previamente descrito.

**VII.3.2 RT-PCR.** Mediante RT-PCR se determinó la expresión de los genes Nestina, PDGFR- $\alpha$  (Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa), CNPasa (2',3'-nucleótido-cíclico 3'-fosfodiesterasa), Olig2, MOG (glicoproteína de mielina de oligodendrocitos), O4 y NG2 (proteoglicano condroitinsulfato) en las CMMH-TA y células inducidas a diferenciación. Estando en su cuarto pase, Las CMMH-TA se expandieron en botellas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie hasta que alcanzaron una confluencia del 90%, se indujeron a diferenciarse (ver la sección II) y se extrajo el ARN.

### **VII.3.3 Extracción de ARN.**

**VII.3.3.1 Extracción de ARN de cerebro humano.** Como control se utilizó cerebro humano, la extracción de ARN se realizó con RNeasy Lipid-Tissue Mini Kit. Se pesaron <100 mg de tejido fresco, se agregó 1 mL de QIAzol Lysis Reagent y se homogenizó con la ayuda de Tissue Ruptor (QIAGEN, New York, USA). El homogenizado se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se agitó el tubo vigorosamente por 15 seg. Se incubó la preparación por 3 min. Se centrifugó a 10,000  $\times$  g por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo, se agregó un volumen (600  $\mu$ L) de etanol al 70% y se agitó vigorosamente con vortex. La muestra se dividió en dos alícuotas. La primera alícuota (700  $\mu$ L) se transfirió a una columna (RNeasy Mini Spin column) colocada en un tubo recolector de 2 mL, se cerró el tubo y se centrifugó por 15 seg a

8,000  $\times g$  en un rotor de ángulo fijo (centrífuga 5415 C Eppendorf), a TA. En cada ocasión, se descartó el líquido. La segunda alícuota se trató de una manera idéntica que a la primera alícuota. Después se lavó tres veces la membrana de la columna, mediante centrifugaciones sucesivas a 8,000  $\times g$  descartando el líquido inmediatamente después de cada centrifugación: la primera vez, la columna se lavó con 700  $\mu\text{L}$  de buffer RW1 y las siguientes dos veces, con 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE. La columna se centrifugó de nuevo. Esta vez, por 1 min, a máxima velocidad (10,000  $\times g$ ) utilizando un tubo recolector nuevo. La columna se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 30-50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsa, directamente sobre la membrana, para eluir el ARN y se centrifugó por 1 min a 8,000  $\times g$  para recuperar el ARN. Se almacenó el RNA disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  a  $-20^\circ\text{C}$ . Se realizó la cuantificación del ARN obtenido en NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Delaware, USA).

**VII.3.3.2 Extracción de ARN CMMH-TA y células inducidas.** A las placas de petri donde se hizo crecer a las células control y células inducidas a diferenciación (ver sección 2.1, pág. 20) se les retiró el medio usado, se les agregó el reactivo de lisis del kit RNeasy Lipid Tissue (Quiagen, California, USA) y se extrajo el RNA Utilizando el kit RNeasy Lipid Tissue y se siguió el protocolo descrito en la sección 3.2.1.1 (Págs. 23-24).

**VII.3.4 RT-PCR.** A partir de  $\sim 250$  ng de ARN tratado con DNAsa I (Invitrogen, Life Technologies, USA) para eliminar ADN genómico, se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando el Kit de retrotranscripción (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen, California, USA). El protocolo para sintetizar el cDNA con el kit es el siguiente: se prepara el Mix I que contiene 1  $\mu\text{L}$  de iniciadores con secuencias al azar (*random primers*), ARN y agua DEPC cbp para obtener un volumen de 11.5  $\mu\text{L}$ . El Mix I se incubaba a  $72^\circ\text{C}$  por 10 min y por 3 min en hielo. Se adiciona el Mix II que contiene 4  $\mu\text{L}$

de Buffer 5x, 2 µL de DTT, 0.5 µL de RNase OUT, 1 µL dNTP's 10 mM, 1 µL de MMLV. El volumen final de la reacción fue de 20 µL los tubos se colocaron en el termociclador y se programó de acuerdo con las condiciones de la Tabla 1 (Pág. 29).

**Tabla 1. Condiciones para la síntesis de cDNA**

Tiempo	Temperatura
10 min	25 °C
1 h	37 °C
5 min	94 °C
10 min	4 °C

A partir del cDNA se llevó a cabo una PCR utilizando la enzima Taq Polimerasa (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, WI, USA). Los oligonucleótidos que se usaron como iniciadores se muestran en la Tabla 2 (Pág. 29).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR**

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Tamaño del amplicón (Pb)
<b>Nestina</b>	TCC AGG AAC GGA AAA TCA AG	TAGAGA CCT CCG TCG CTG TT	388 <sup>a</sup>
<b>Olig2</b>	TAA AAG GCA GTT GCT GTG GA	GAC GCT ACA AAG CCC AGT TT	286 <sup>a</sup>
<b>PDGFR-α</b>	CGCTTCCTGATATTGAGTGG	TCGGGAGTGGATCTCCGTGA	116 <sup>b</sup>
<b>CNPasa</b>	AAC TGA CCC TCC CTT CCT GT	GGT AAA TAG CCC CAG CCT TC	523 <sup>b</sup>
<b>MOG</b>	TTG GTG AGG GAA AGG TGA CT	TCA AAA GTC CGG TGG AGA TT	280 <sup>b</sup>
<b>GAPDH</b>	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC G	AAG GCC ATG CCA GTG AGC TTC	470 <sup>c</sup>
<b>NG2</b>	ACT GGC TAG GGG TGT CAA TG	TCC TCA AGG TCC TGC TGA GT	271 <sup>c</sup>
<b>O4</b>	CTA CTG CTC TGG GTC CCA GG	CTG CCA CTG AAC CGA GAT GG	348 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>oligonucleótidos tomados de [41], <sup>b</sup>oligonucleótido tomado de [47], <sup>c</sup>oligonucleótidos tomados de [48]

Las condiciones para la amplificación de GAPDH fueron 95°C/5 min, 30 ciclos (94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min) y 72°C/5 min, para Nestina, Olig2, CNPasa, MOG

95°C/5 min, 30 ciclos (94°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min) y 72°C/5 min, para PDGFR- $\alpha$  95°C/5 min, 30 ciclos (94°C/1 min, 62°C/2 min, 72°C/2 min) y 72°C/5 min, para NG2 95°C/5 min, 30 ciclos (94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min) y 72°C/5 min y O4 95°C/5 min, 35 ciclos (94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/30 seg) y 72°C/10 min.

Después de la amplificación, los productos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90v, las bandas de DNA se visualizaron con bromuro de etidio en un fotodocumentador de luz UV (Gel Documentation System 1000, BIORAD). El tamaño de los amplificados se verificó corriendo el marcador de peso molecular de 1 kb (100 bp ladder, PROMEGA).

**VII.3.5 RT-PCR tiempo real.** A partir del cDNA sintetizado (ver apartado VII.3.4, Pág 27) se llevó a cabo el análisis de expresión con PCR tiempo real. Los genes que se analizaron fueron MBP, PLP y como gen constitutivo GAPDH, los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 3 (Pág.29). Las reacciones se hicieron en placas de 96 pocillos, en el aparato 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Lincoln, CA, USA). En cada reacción de PCR se mezcló SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixes for ABI PRISM®, con cDNA (a partir de 250ng ARN) y los oligonucleótidos específicos en un volumen total de 20  $\mu$ L. Las condiciones para la amplificación de los tres genes fueron 95°C/10 min, 40 ciclos (95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR tiempo real

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Tamaño del amplicón (Pb)
MBP	CTG GGC AGC TGT TAG AGT CC	CTG TGG TTT GGA AAC GAG GT	275 <sup>a</sup>
PLP	GGC GAC TAC AAG ACC ACC AT	AGG TGG TCC AGG TGT TGA AG	247 <sup>a</sup>
GAPDH	TCGCCAGCCGAGCCA	CCTTGACGGTGCCATGGAAT	215 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Oligonucleótidos tomados de [48], <sup>b</sup>Oligonucleótidos tomados de [36]



## VII.4 ANÁLISIS DE DATOS

**VII.4.1 Caracterización mediante inmunocitoquímica.** Se realizó un análisis morfológico, mediante la cuantificación de las células que fueron positivas o negativas para el marcaje con el anticuerpo anti-MBP y anti PLP. Para ello se tomaron tres laminillas y se cuantificaron ocho campos al azar. Con estas cuantificaciones se calculó el porcentaje de células positivas a cada uno de los marcadores analizados con respecto al número total de células cuantificadas.

**VII.4.2 RT-PCR.** Los productos obtenidos mediante RT-PCR se sometieron a electroforesis para verificar que correspondían a los tamaños esperados. La intensidad de las bandas obtenidas en los geles de agarosa se analizó con ayuda del software Image Lab 5.0 (Biorad). Con los valores entregados por este software se realizó una prueba de t de student para comparar la expresión relativa de los diferentes genes analizados entre células control y células inducidas a diferenciación. Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (versión 7) con una significancia de  $p \leq 0.05$ . Cada uno de los resultados fue normalizado con la expresión del gen constitutivo GAPDH.

### VII.4.3 RT-PCR tiempo real.

El método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ , fue usado para el análisis de expresión. Todos los valores de Ct calculados para los genes fueron normalizados con GAPDH.

## VIII. ASPECTOS ÉTICOS

En este trabajo utilizamos tejido graso humano de desecho, producto de una cirugía practicada a un paciente por razones estéticas por el Dr. Yanko Castro Govea, colaborador del presente proyecto. El paciente era mayor de edad, gozaba de todas sus facultades mentales, estaba en perfectas condiciones de salud y dio a nuestro

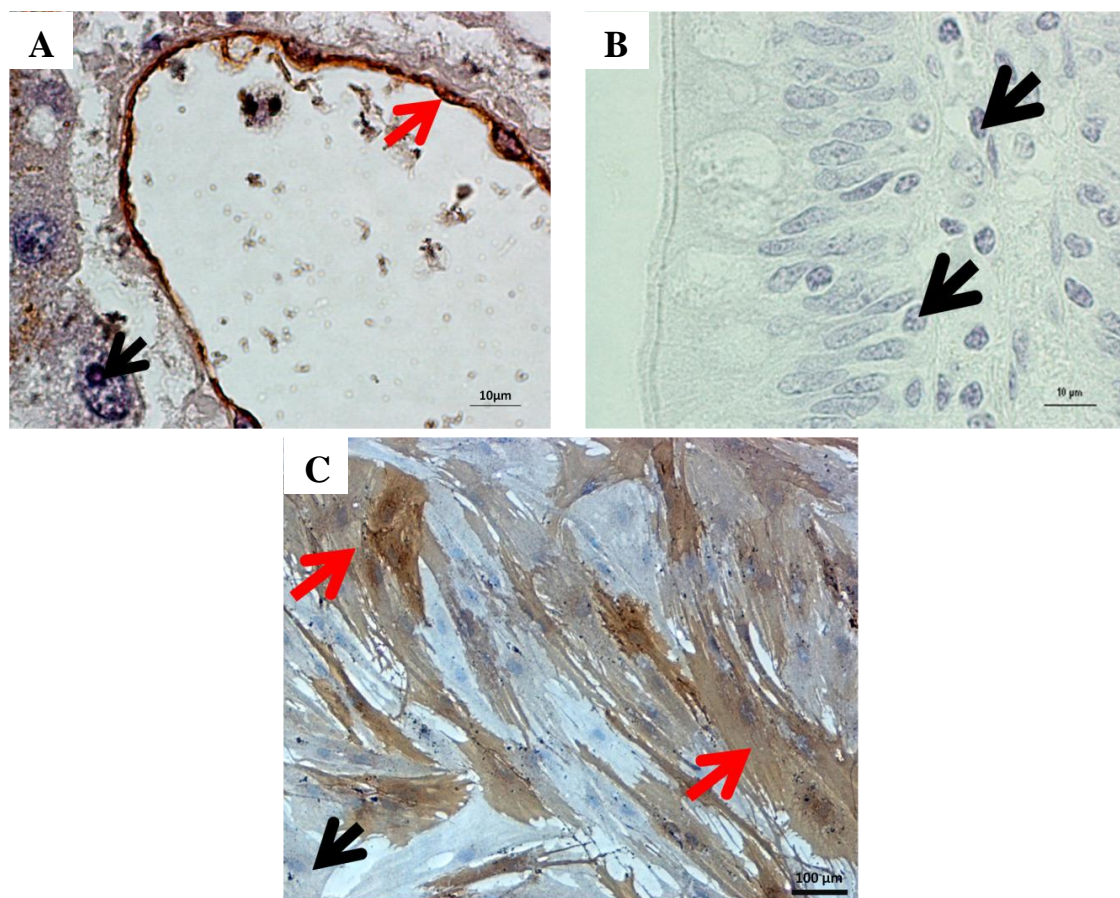
equipo de trabajo su consentimiento para realizar este estudio. En todo este proceso todos los derechos de dicho paciente fueron respetados. Por otro lado, utilizamos muestras de cerebro humano de un cadáver, que nos fue donado por el Departamento de Medicina Forense del Hospital Universitario de la UANL, de conformidad con el Reglamento de la Ley General de Salud, en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos, (Capítulo V, artículos 58, 59, 60 y 62) y no incurrimos en ninguna falta a los códigos de ética ni de buenas prácticas clínicas. Este proyecto fue autorizado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la UANL y registrado con el número: BI14-005.

## IX. RESULTADOS

### IX.1 CMMH-TA

#### IX.1.1 Aislamiento y caracterización de CMMH-TA.

Las células aisladas del tejido adiposo de un donador humano, que utilizamos para realizar el presente estudio, se adhirieron al sustrato plástico de las cajas de cultivo y mostraron una morfología ahusada, como se muestra en la Fig. 8A (Pág. 32). Respecto a la caracterización por ICQ, las células aisladas del tejido adiposo fueron positivas para el marcador CD105 como se muestra en la Fig. 7. Todas estas características son típicas de las CMM.

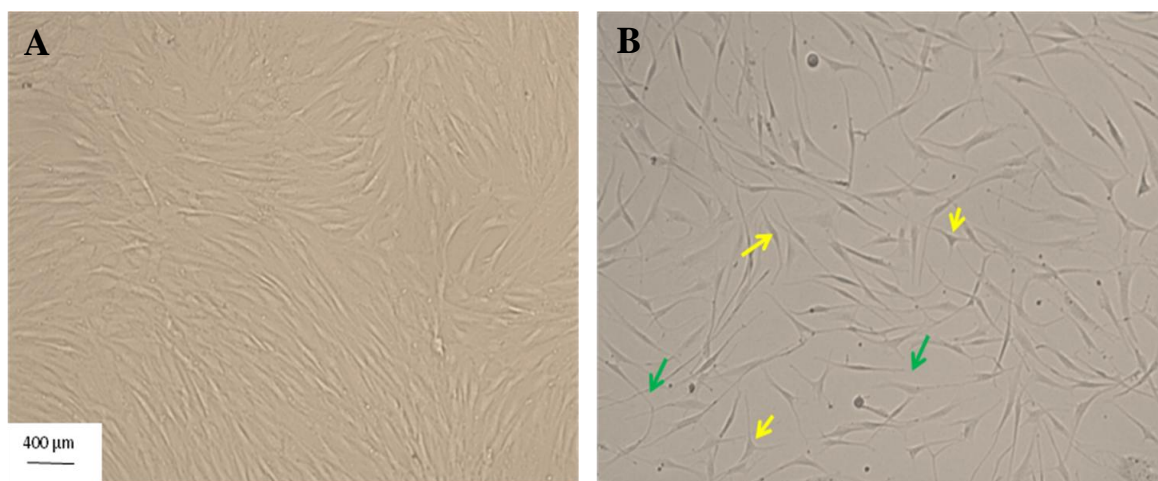


**Figura 7. Caracterización de CMMH-TA por ICQ.** A) Reacción positiva para el marcador CD105 en el endotelio de la vena central en hígado humano (flecha roja), B) corresponde a yeyuno como testigo negativo no observándose positividad para CD105. En ambas micrografías se muestran los núcleos contrateñidos (flechas negras). C) Obsérvese la positividad de color marrón en las membranas de CMMH-TA, denotando la expresión de CD105 (flechas rojas) y células negativas (flechas negras).

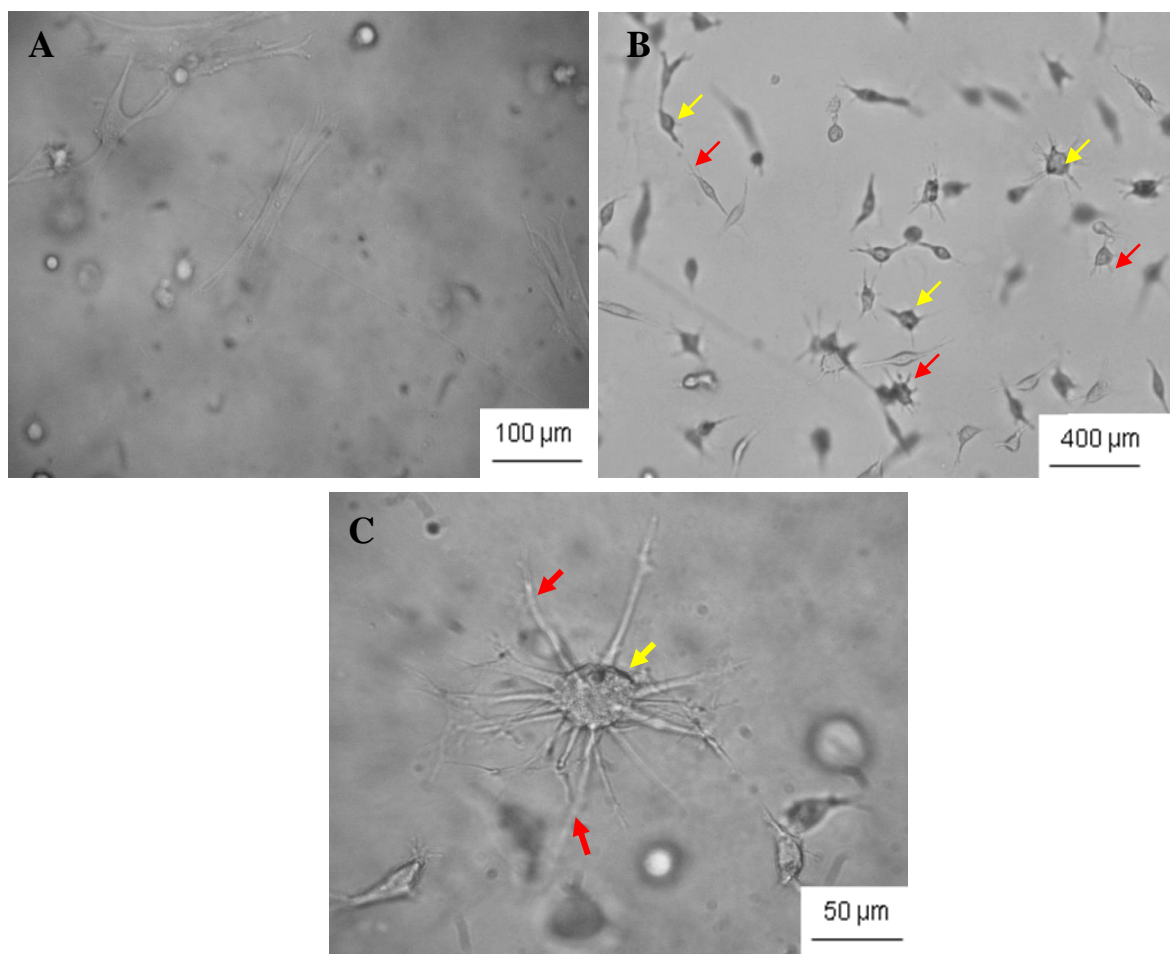
## IX.2 DIFERENCIACIÓN

**IX.2.1 Diferenciación de CMMH-TA a oligodendrocitos.** Las CMMH-TA inducidas para diferenciarse a oligodendrocitos y cultivadas en monocapas (2D) presentaron cambios notables en su morfología. La mayor parte de estas células presentaron un cuerpo central, a partir del cual se extendían numerosas y largas prolongaciones celulares hacia una o más direcciones. Varias de estas prolongaciones estaban bifurcadas (Fig. 7B).

**IX.2.2 Diferenciación de CMMH-TA a oligodendrocitos en cultivos 3D.** El Matrigel, un andamio utilizado para obtener cultivos en 3D permitió que las células crecieran y se diferenciaron a oligodendrocitos en diferentes planos. La Fig. 9 (Pág. 34) muestra de una manera más evidente lo observado en monocapas, que las células diferenciadas tienen un cuerpo central, voluminoso y redondeado, a partir del cual se extienden largos procesos en diferentes direcciones, abarcando los tres planos.



**Figura 8. Microfotografías de cultivos en monocapa.** Se muestra en A) cultivo de células sin diferenciar (CMMH-TA), B) cultivo de células inducidas a diferenciación. Con flechas en color amarillo se señalan los cuerpos celulares mientras que con flechas en color verde las prolongaciones citoplasmáticas.

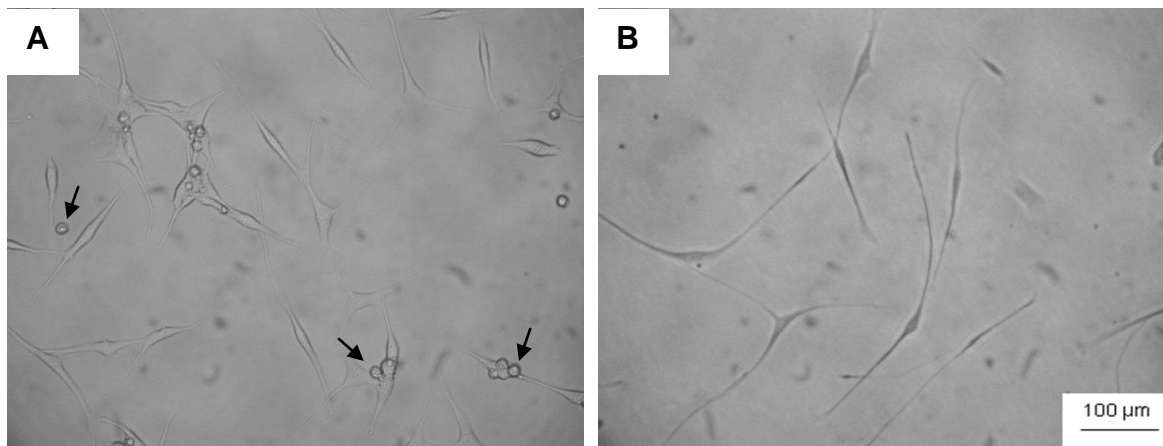


**Figura 9. Microfotografías de cultivos en Matrigel.** Se muestra en A) cultivo de células sin diferenciar (CMMH-TA), B) y C) cultivo de células inducidas a diferenciación. Con flechas en color amarillo se señalan los cuerpos celulares mientras que con flechas en color rojo las prolongaciones citoplasmáticas.

### **IX.2.3 Cocultivo.**

Las células tratadas se cocultivaron con neuronas (mHypoA-61) con el fin de estudiar el papel que juegan estas últimas en la diferenciación celular de células mesenquimales a oligodendrocitos. Se observó poca interacción entre ambas células ya que las neuronas se adhirieron poco a las botellas de cultivo y la interacción fue superficial, como se muestra en la Fig. 10A. (Pág. 35), las neuronas se observan

redondas cercanas a las células inducidas a diferenciación adheridas a la botella, sin embargo se observa que el cocultivo favoreció la densidad y tamaño celular de las células inducidas a diferenciación, ya que si se comparan con las células inducidas a diferenciación sin neuronas (Figura 10B, Pág. 35) estas son más delgadas y están en menor confluencia.



**Figura 10. Microfotografías de Cocultivo.** Microfotografías del cultivo CMMH-TA inducidas a diferenciación se muestra en A) Co-cultivo de células inducidas a diferenciación con neuronas mHypoA-61, con flechas en color negro se señalan a las neuronas B) Células inducidas a diferenciación.

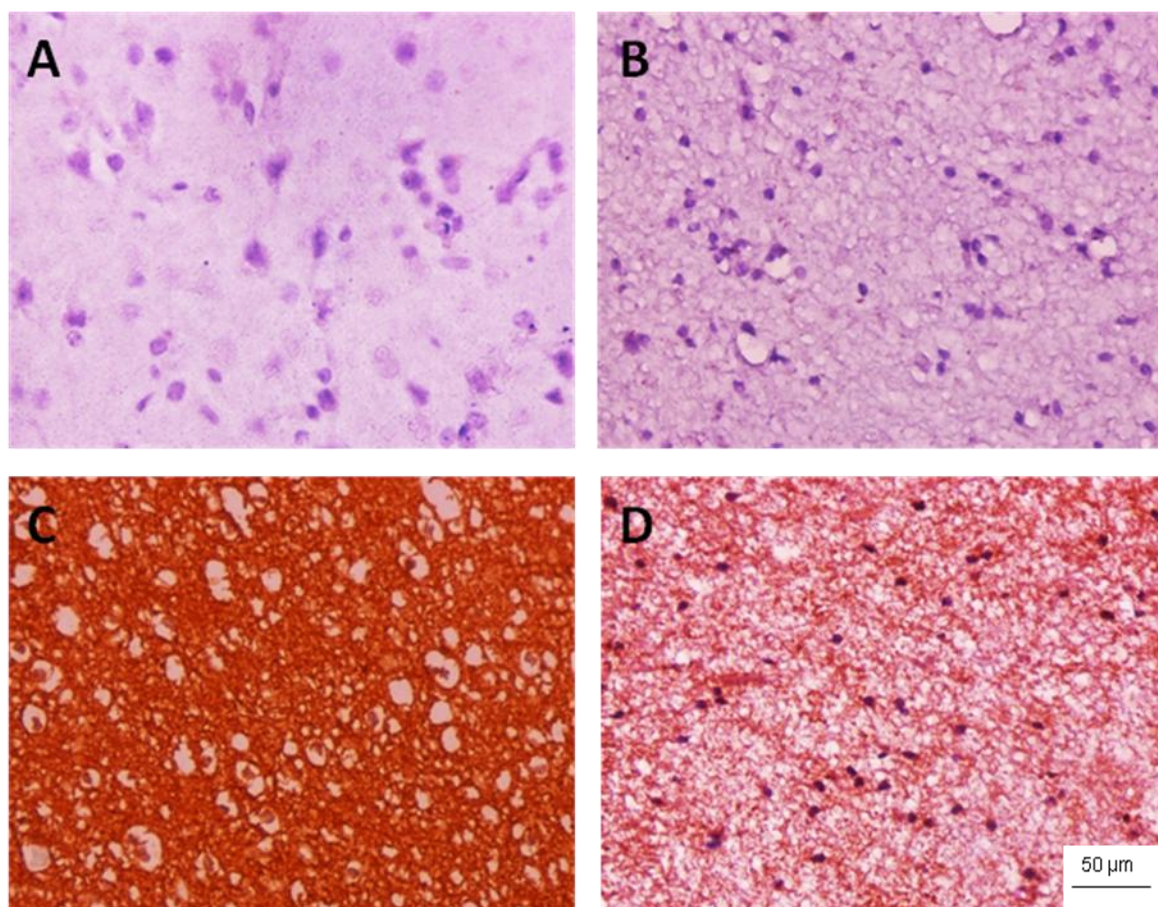
### IX.3 CARACTERIZACIÓN DE CMMH-I

#### IX.3.1 Inmunocitoquímica de CMMH-I

La técnica de ICQ se estandarizó utilizando cortes de cerebro humano. La sustancia blanca, al tener los axones mielinizados, sirvió como control positivo para nuestros marcadores de mielina. Como control negativo de nuestra técnica omitimos el anticuerpo primario. Se incluyó un corte de la sustancia gris de un cerebro humano como control negativo, debido a que esta carece de mielina. La Fig. 11 (Pág. 36) muestra microfotografías de cerebro marcadas con Ac anti-MBP (anti-Proteína Básica de la Mielina). Para estandarizar nuestra técnica, se ensayaron dos diluciones de los Ac monoclonales (1:50 y 1:100) y se observó que a una dilución 1:100 se tiene buena



detección y permite observar las estructuras celulares de una mejor manera que con la concentración de Ac anti-MBP 1:50.

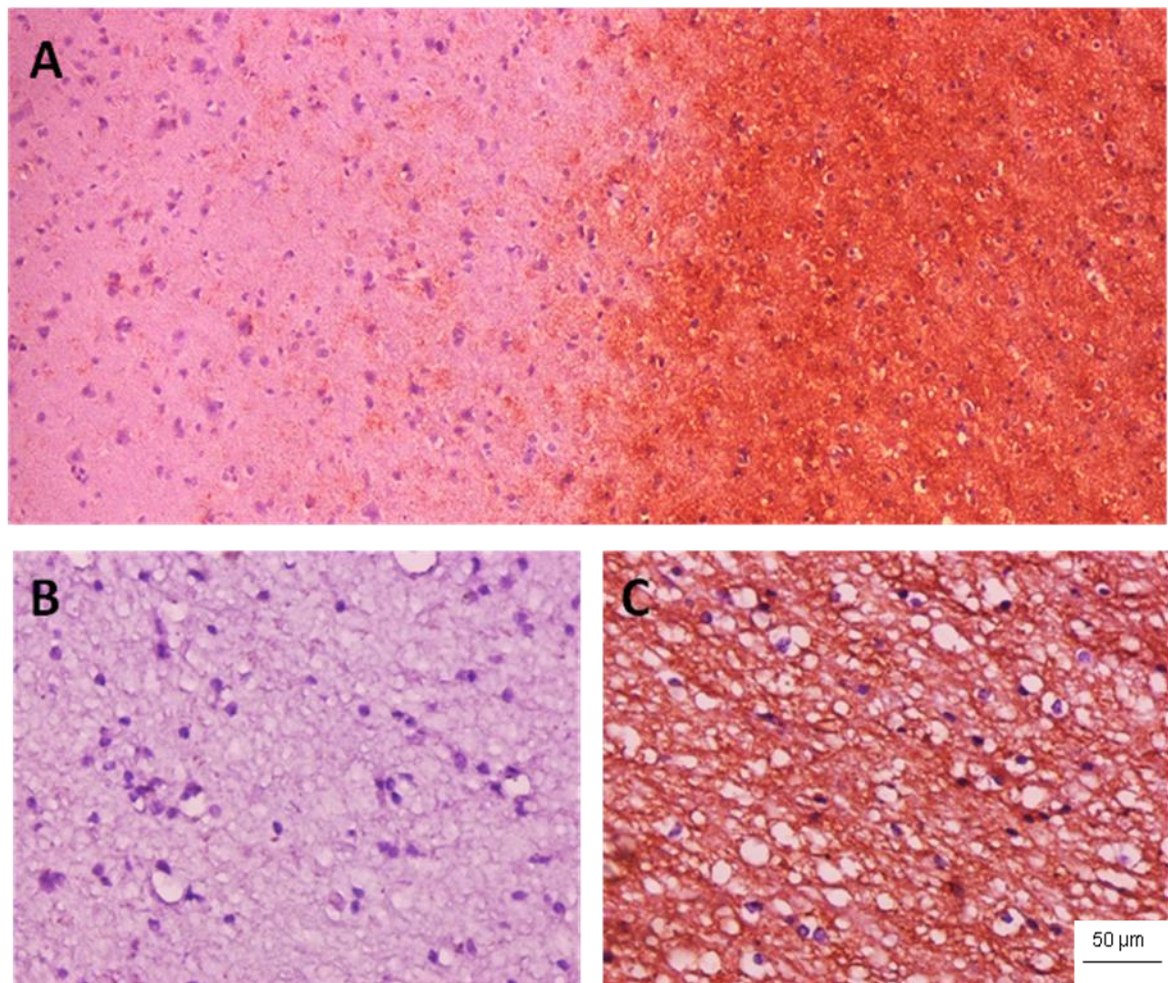


**Figura 11. Estandarización de la técnica ICQ para anti-MBP.** Microfotografías de cortes de cerebro humano A) control de la técnica (sustancia gris), B) control negativo en donde se omite el Ac primario (sustancia blanca), C) dilución 1:50 del Ac anti-MBP (sustancia blanca), D) dilución 1:100 del Ac anti-MBP (sustancia blanca). De las dos diluciones probadas la que permite observar las estructuras celulares de mejor manera es la Dilución 1:100.

De igual manera que el Ac anterior, se ensayó una dilución 1:100 del Ac monoclonal anti-PLP (anti-Proteína Proteolipídica). La Fig. 12 (Pág. 37) muestra microfotografías de cortes de cerebro humano marcadas con anti-PLP. Con una dilución 1:100 de los anticuerpos fue posible detectar la presencia de la PLP sobre la superficie de las

células inducidas para diferenciarse a oligodendrocitos, además, se observaron algunas estructuras celulares. Por lo anterior, la dilución 1:100 de los Ac monoclonales anti-PBM y anti-PLP fue la utilizada para caracterizar a las células diferenciadas.

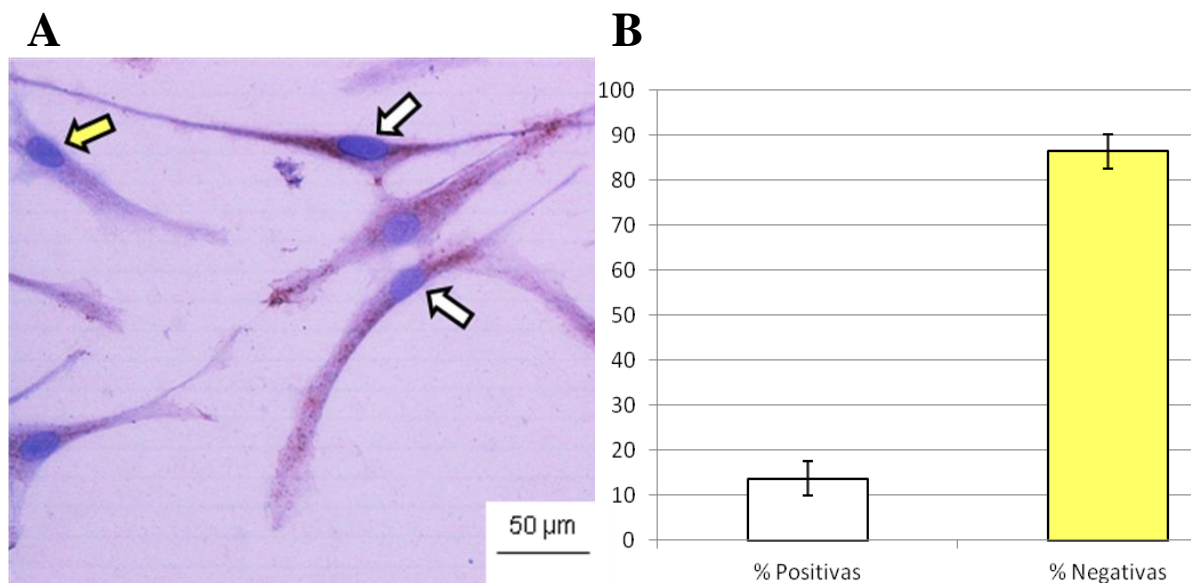
La presencia en la superficie de las células diferenciadas u oligodendrocitos-like de MBP y PLP, se denota por un color marrón en el citoplasma celular. Los núcleos celulares, contrateñidos con hematoxilina y se observan claramente de color morado.



**Figura 12. Estandarización de la técnica ICQ para anti-PLP.** Microfotografías de cortes de cerebro humano A) control de la técnica (sustancia blanca/gris), B) control negativo en donde se omite el Ac primario (sustancia blanca), C) dilución 1:100 del Ac anti-PLP (sustancia blanca).



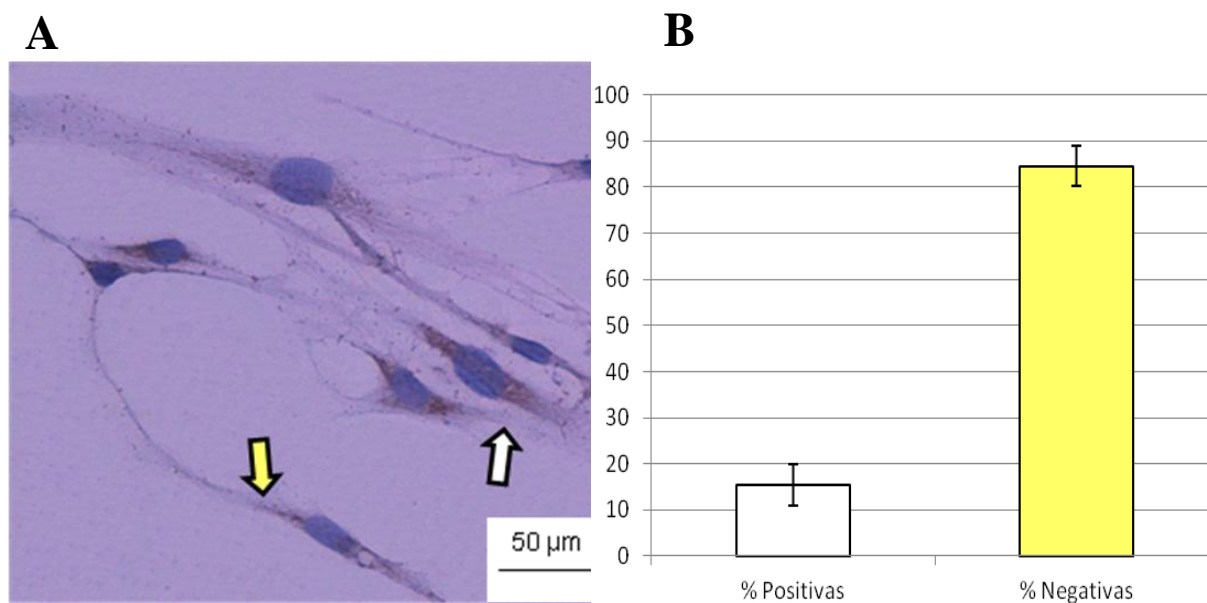
A continuación se llevó a cabo el marcaje de las células CMMH-TA y células inducidas a diferenciación. La figura 13 (Pág. 38) muestra el marcaje con anti-MBP. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico se obtuvo que el porcentaje de células positivas es de  $13.36 \pm 7.25$ .



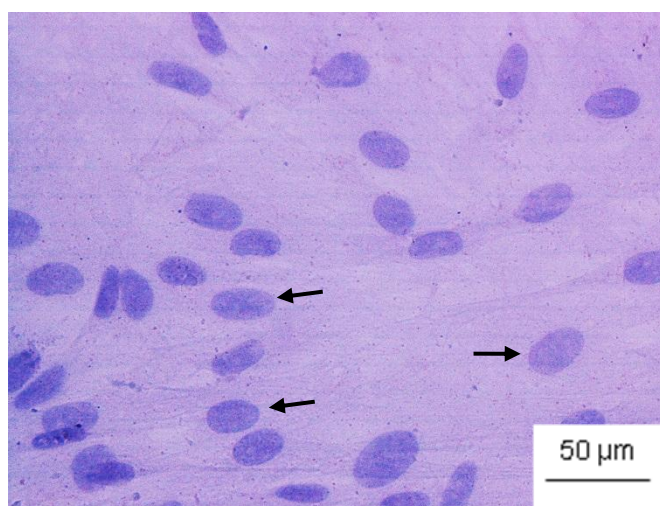
**Figura 13. Caracterización por ICQ de las células inducidas a diferenciación con anti- MBP.** A) Microfotografía de células inducidas a diferenciación, obsérvese la positividad de color marrón en las membranas, denotando la expresión de MBP (flechas blancas), las células negativas están señaladas por una flecha amarilla. B) Gráfico del porcentaje de células positivas y negativas a MBP obtenido del análisis morfométrico.

La Fig. 14A muestra el marcaje con anti-PLP. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico se obtuvo el porcentaje de células positivas siendo de  $15.37 \pm 7.73$  (Fig. 14B).

Las células sin tratar se marcaron con los mismos anticuerpos que las células tratadas, siendo estas negativas (Fig. 15 (Pág. 39)).



**Figura 14. Caracterización por ICQ de las células inducidas a diferenciación con anti-PLP.** A) Microfotografía de células inducidas a diferenciación, obsérvese la positividad de color marrón en las membranas, denotando la expresión de PLP (flechas blancas), las células negativas están señaladas por una flecha amarilla. B) Gráfico del porcentaje de células positivas v negativas a PLP obtenido del análisis morfométrico.

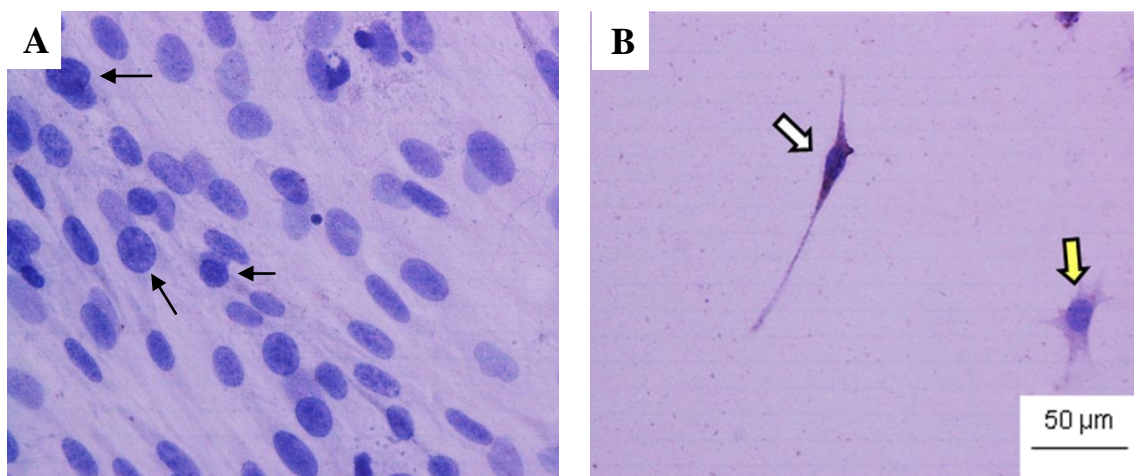


**Figura 15. Control de la técnica de ICQ.** Células madre mesenquimales de tejido adiposo (CMMH-TA), se muestran los núcleos teñidos con hematoxilina señalados con flechas en color negro.

### IX.3.2 Inmunocitoquímica de cocultivo.

Se realizó marcaje de las células cocultivadas con neuronas hipotalámicas de ratón (mHypoA-61), con los anticuerpos anti-PLP y anti- MBP.

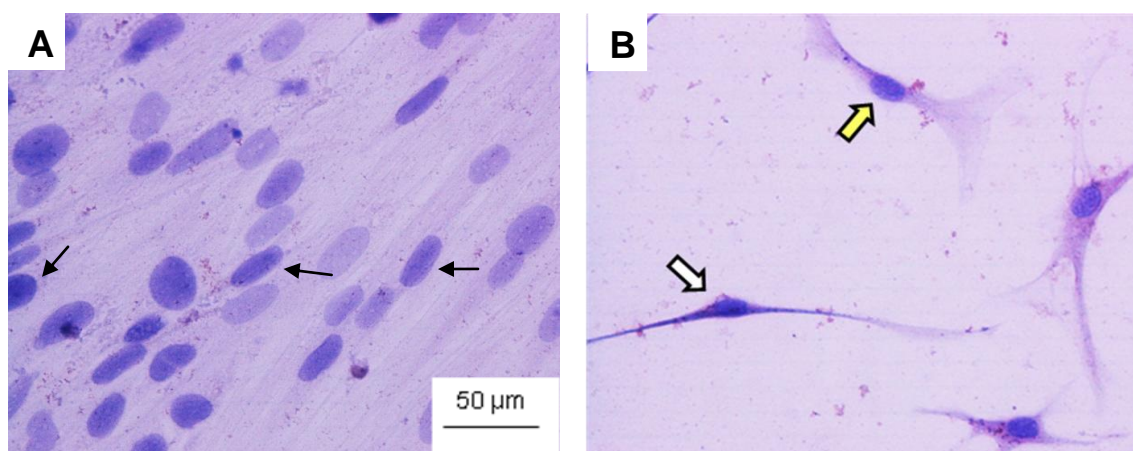
En la figura 16A (Pág. 40) se muestran las células control (CMMH-TA) cocultivadas con las neuronas (línea celular mHypoA-61), las cuales son negativas para el anticuerpo anti-MBP mientras que en la figura 16B se observan las células diferenciadas positivas al marcador. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico se obtuvo el porcentaje de células positivas, siendo de  $20.10 \pm 2.5$ .



**Figura 16. Caracterización por ICQ del cocultivo con anti- MBP.** Microfotografías de A) Cocultivo de CMMH-TA y neuronas de la línea celular mHypoA-61, con flechas negras se señalan núcleos sobrepuestos que sugieren se trata de las neuronas B) Cocultivo de células inducidas a diferenciarse y neuronas, se señala con una flecha blanca las células positivas a MBP y con una flecha amarilla las células negativas.

La figura 17A (Pág. 41) muestra células sin diferenciar negativas a PLP, mientras que la positividad de las células diferenciadas al marcador PLP ( $19.46 \pm 3.7\%$ ) se observa de un color marrón

Cabe señalar que las neuronas se adhirieron pobremente, son negativas a los marcadores y no se observan en el cocultivo con las células inducidas a diferenciación.



**Figura 17. Caracterización por ICQ del cocultivo con anti- PLP.** A) Cocultivo de CMMH-TA y neuronas de la línea celular mHypoA-61, con flechas negras se señalan núcleos sobrepuestos que sugieren se trata de las neuronas B) cocultivo de células inducidas a diferenciarse y neuronas, se señala con una flecha blanca las células positivas a PLP, con una flecha amarilla las células negativas.

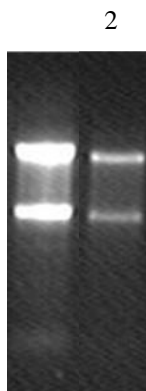
#### IX.4 RT-PCR Y qRT-PCR

##### IX.4.1 *Obtención de ARN.*

**IX.4.2 Calidad del material genético de cerebro humano.** Se llevó a cabo la extracción de ARN de cerebro humano para utilizarse como control de amplificación de los marcadores con los que se caracterizó a las células diferenciadas. En la figura 18 (Pág. 42) se muestra el patrón electroforético del ARN total de una muestra de cerebro humano, tratado y sin tratar con DNAsa. Se observan dos bandas bien delimitadas e intensas en las muestras tratadas o no con DNAsa. La banda que muestra el ARN libre de DNA en el carril 2 es más tenue, esto debido a que se diluye la muestra al tratarse con DNAsa, sin embargo lo que se trata de representar es la integridad del ARN antes y después del tratamiento con DNAsa.

**IX.4.3 Cuantificación de la expresión de los genes específicos de oligodendrocitos.** Se analizó la expresión de los genes de Nestina, Olig2, CNPasa, MOG, NG2, O4 y PDGFR- $\alpha$  mediante RT-PCR, previamente estandarizada con ARN

de cerebro humano. Mediante PCR, se analizó el cDNA de los genes arriba mencionados. Se obtuvieron bandas de tamaños esperados (Nestina (364pb), Olig2 (286 pb), CNPasa (523 pb), MOG (280 pb), NG2 (271pb), O4(348 pb) y PDGFR- $\alpha$  (116 pb) (Fig. 19, Pág. 43).

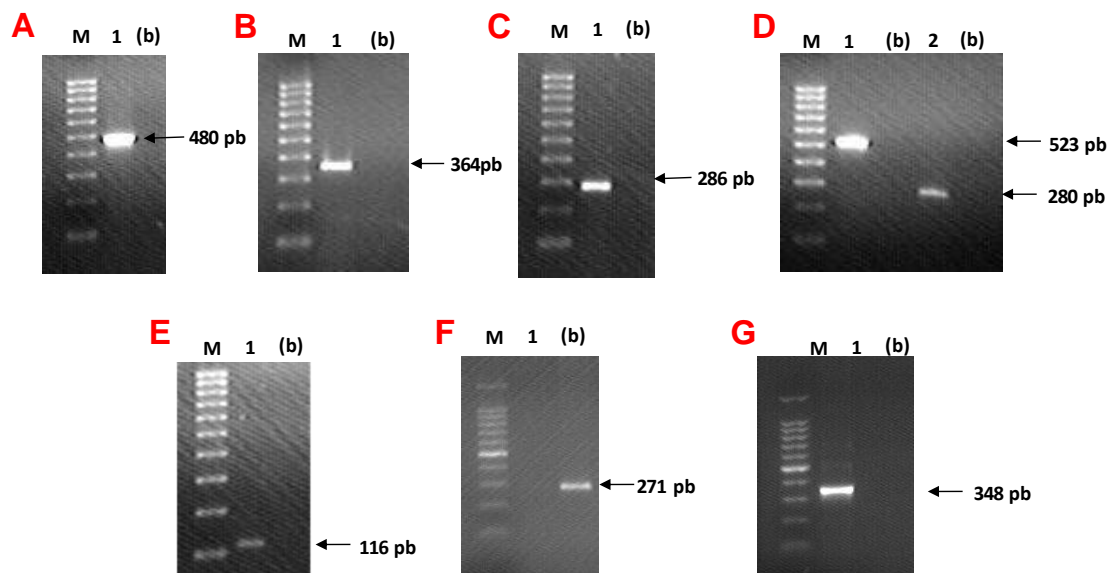


**Figura 18. Interidad del ARN.** Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras de ARN de cerebro. Carril 1: ARN de cerebro sin tratar, carril 2 ARN tratado con DNAsa.

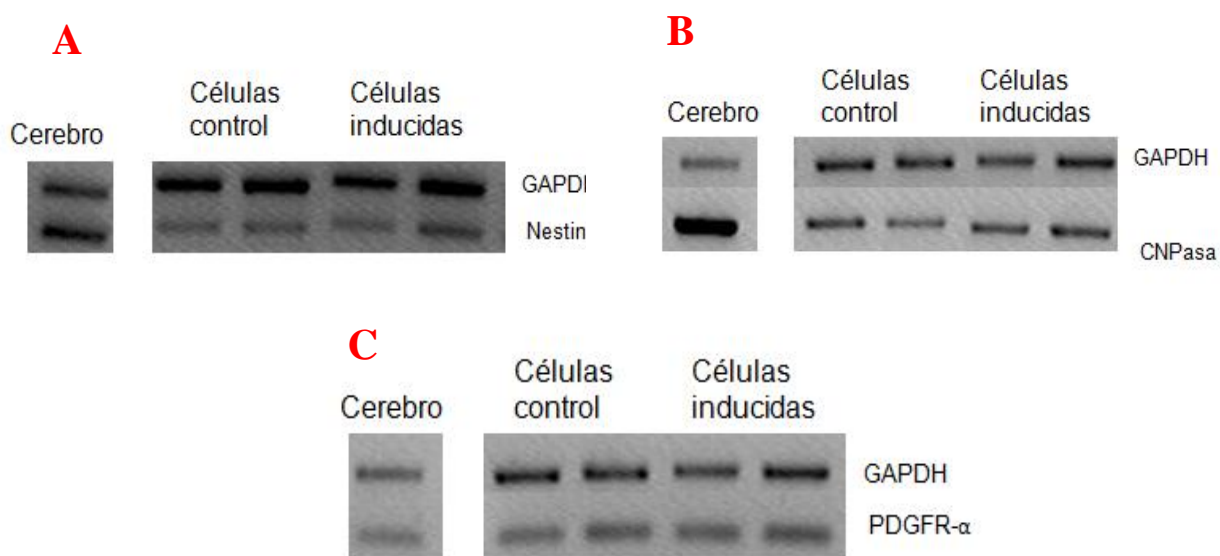
Una vez estandarizadas las condiciones de PCR, se llevaron a cabo los ensayos de expresión génica de las células inducidas a oligodendrocitos.

Se encontró que las CMMH-TA y las células inducidas a oligodendrocitos expresaron genes Nestina, CNPasa y PDGFR- $\alpha$  (Fig. 20, Pág.42). Sin embargo, después de llevar a cabo el análisis densitométrico la expresión de los genes de Nestina, CNPasa y PDGFR- $\alpha$  de las células inducidas a diferenciarse a oligodendrocitos fue significativamente mayor que las CMMH-TA (no inducidas) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 21 y 22, Pág. 44), en tanto que el gen constitutivo de GAPDH, que se utilizó como normalizador no mostró diferencias bajo ninguna circunstancia experimental.

Por otro lado, no se encontró expresión de los genes Olig2, MOG, NG2 y O4, ni en las CMMH-TA ni en las células inducidas a diferenciarse.

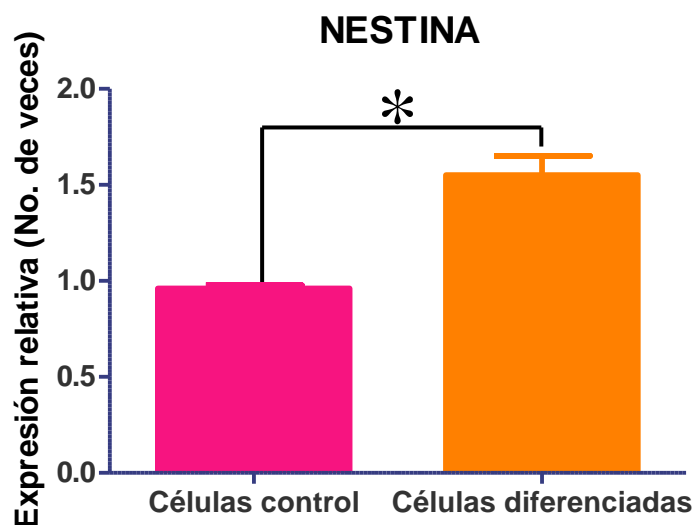


**Figura 19. Estandarización de la PCR.** Geles de agarosa 1% de los productos de PCR de A) gen GAPDH tamaño de amplicon 480 pb, B) gen nestina tamaño de amplicon 388 pb, C) gen Olig2 tamaño de amplicon 286 pb, D) gen CNPasa (1) tamaño de amplicon 523 pb, gen MOG (2) tamaño de amplicon 280 pb, E) gen PDGFR- $\alpha$  tamaño de amplicon 116pb, F) gen NG2 tamaño de amplicon 271 pb, G) gen O4 tamaño de amplicon 348 pb. (M) marcador de peso molecular 1 Kb, (b) blanco.

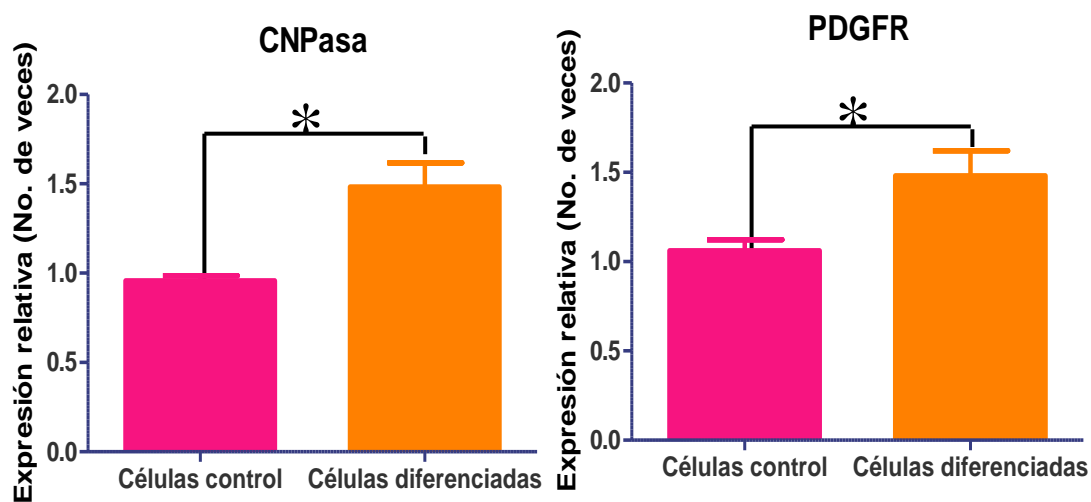


**Figura 20. Ensayos de PCR de células inducidas a diferenciación y células control.** Geles de agarosa de los productos de PCR A) de los genes Nestina y GAPDH B) CNPasa y GAPDH C) PDGFR- $\alpha$  y GAPDH. En células inducidas a diferenciarse comparadas con células control.





**Figura 21. Gráfico de la expresión relativa del gen Nestina.** Gráfico del análisis de expresión relativa del gen Nestina en células inducidas a diferenciarse comparadas con células sin tratar. \*  $P < 0.05$



**Figura 22. Gráfico de la expresión relativa de los genes CNPasa y PDGFR- $\alpha$ .** Gráficos del análisis de expresión relativa de los genes CNPasa y PDGFR- $\alpha$  en células inducidas a diferenciarse comparadas con células sin tratar. \*  $P < 0.05$

#### IX.4.4 Cuantificación de la expresión de MBP y PLP

Debido a que algunos marcadores de linaje oligodendrocítico no fueron detectados por PCR punto final, analizamos la expresión de los genes MBP y PLP mediante RT-PCR tiempo real. En estos experimentos usamos como control interno el gen constitutivo GAPDH.

Con los resultados de Ct (ciclo en el cual incrementa la señal de fluorescencia con respecto a la señal de fondo o basal) obtenidos por tiempo real se hicieron los cálculos para obtener el  $\Delta\Delta Ct$ . En la figura 23 se muestra el gráfico correspondiente de la amplificación de MBP y PLP, tanto de las CMMH-TA usadas como control negativo, como de las células inducidas a oligodendrocitos. Como se observa en el gráfico, la expresión de los genes MBP y PLP fue mayor en las células inducidas a diferenciarse a oligodendrocitos que las células control (CMMH-TA), esta diferencia en la expresión es significativa ( $p < 0.05$ ) en ambos genes.

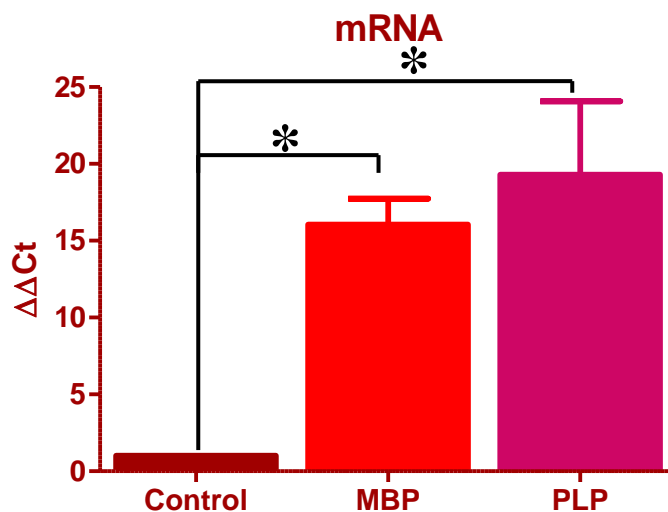


Figura 23. Gráfico de la Expresión relativa de los genes MBP y PLP. Gráfico del análisis de expresión relativa de los genes MBP y PLP ( $\Delta\Delta Ct$ ) en células tratadas para diferenciarse comparadas con células sin tratar. \*  $P < 0.05$



## X. DISCUSIÓN

### *X.1 Ventajas del TA como fuente de CMM para diferenciarlas a oligodendrocitos*

El tejido adiposo es una fuente accesible y abundante de CMM capaces de diferenciarse a varios tipos celulares. Estas características les brindan ventaja a las CMM-TA con respecto a las CMM obtenidas de medula ósea. Por ello, las CMM-TA son una fuente atractiva para la medicina regenerativa [49]. Debido a que las CMM-TA pueden diferenciarse *in vitro* en neuronas o células gliales [49], éstas pueden usarse como reemplazo de las células dañadas en la LME, el autotrasplante de CMMH-TA también ayuda en la neuroprotección y regeneración axonal [50]. Entonces, para obtener células parecidas a oligodendrocitos (oligodendrocitos-*like*), en este trabajo, inicialmente obtuvimos CMM de lipoaspirados. Estas eran células fusiformes, adherentes que presentaron el marcador de membrana CD105; todas estas características las definen como CMM de acuerdo a la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) [51].

### *X.2 Principales modificaciones al protocolo original de diferenciación*

El protocolo de diferenciación que nosotros seguimos en el presente estudio es una modificación del publicado por Abbaszadeh H-A. y cols. [37]. Las principales modificaciones que le hicimos a dicho método fueron los cultivos en tres dimensiones (3D) y cocultivos en presencia de células precursoras de neuronas. Las modificaciones en la forma de cultivar a las células inducidas obedecieron a la necesidad de investigar si estas modalidades de cultivo podrían estimular la expresión de cuatro marcadores que no se expresaron cultivados con la modalidad convencional de dos dimensiones (en monocapa), lo cual discutimos más adelante. Las células que nosotros indujimos, siguiendo dicho protocolo, presentaron cambios en su fenotipo indistinguible del linaje de oligodendrocitos.

### *X.3 Adopción, por las CMMH-TA inducidas de una morfología típica de oligodendrocitos*

Entre los cambios morfológicos que nosotros observamos está la formación de un cuerpo central voluminoso y esférico, a partir del cual emergían largas y abundantes prolongaciones en diversas direcciones. Este cambio morfológico ha sido reportado por otros autores [52] [44] [36] [53] [10] [54] [41] [38] [42]. Sin embargo, las conformaciones adoptadas por las células diferenciadas difieren entre los resultados de los diversos protocolos. Esto es debido a que las células diferenciadas a oligodendrocitos derivan de CMM de diferentes orígenes. También influyen en este fenómeno los protocolos de diferenciación utilizados. A pesar de todo ello, nosotros obtuvimos oligodendrocitos con una morfología muy parecida a los oligodendrocitos formados naturalmente (*oligodendrocitos-like*).

### *X.4 Expresión de marcadores a nivel de traducción*

Las células inducidas por nosotros para diferenciarse a oligodendrocitos expresaron la proteína básica de la mielina (MBP) en su citoplasma, detectada mediante inmunocitoquímica. Lo cual sugiere fuertemente que, al menos una parte de nuestra población celular se diferenció hasta expresar la MBP; una proteína típica de la mielina, producida por oligodendrocitos maduros [5]. Para lograr esta diferenciación, varios autores [33] [5] han mencionado que un factor indispensable es la triyodotironina (T3). La concentración de T3 es crítica para conseguir una expresión de las proteínas típicas de la mielina por CMM inducidas para diferenciarse a oligodendrocitos. Kaka y Cols. [10], p.e. no detectaron en sus cultivos expresión de la MBP, utilizando 10ng/mL de T3 en su medio de diferenciación. En cambio, Abbaszadeh y Cols. sí lograron que sus cultivos de CMM de médula ósea de rata expresaran MBP, porque ellos adicionaron a su medio de diferenciación dosis mayores de T3 (25ng/mL). Nosotros usamos una concentración de T3 aún mayor que la utilizada por Abbaszadeh y Cols. (35ng/mL); la

cual produjo una excelente diferenciación de nuestras células. Czepiel y Cols. reportaron un 18% de células que expresaron MBP; porcentaje similar al que nosotros obtuvimos de nuestros cultivos [32]. El tiempo de incubación durante la diferenciación también parece ser un factor fundamental para que las CMM alcancen un grado aceptable de diferenciación. Tracy y Cols., reportaron que a tiempos largos de cultivo, el porcentaje de células positivas a MBP aumenta de 10% (7 días ) a 51% tras 28 días de cultivo [55]. Nosotros obtuvimos un 14.4% de oligodendrocitos-*like* positivos a MBP. Entonces, posiblemente podríamos aumentar el porcentaje de oligodendrocitos-*like* productores de MBP incrementando los tiempos de inducción y la concentración de T3. Por otro lado, es muy importante aclarar que nuestros cultivos no diferenciados—de donde partimos en el presente estudio—no estaban compuestos exclusivamente por CMM, había varias otras estirpes de células, y este factor seguramente también influyó fuertemente en los porcentajes de células productoras de proteínas de mielina.

Otro de los marcadores específicos de mielina, expresado por nuestros oligodendrocitos-*like* fue la proteína proteolipídica (PLP) la cual fue detectada en el  $15.37 \pm 7.73\%$  de las células, mediante inmunocitoquímica. Nosotros detectamos la presencia de PLP, a pesar de que aún no hay reportes de los porcentajes de células positivas a este marcador en otros protocolos de diferenciación, al menos, no a nivel de traducción. Entonces, esta es la primera vez que se reporta la expresión de esta importante proteína y fue expresada por nuestras CMMH-TA. PLP constituye el 80% de las proteínas totales de la mielina junto con la MBP. Ambas proteínas, PLP y MBP, son marcadores de madurez de las células mielinizantes [5]. Por otro lado, mediante qRT-PCR detectamos y cuantificamos los exones de MBP y PLP. En conjunto, los datos del presente estudio de la inmunocitoquímica y qRT-PCR de MBP y PLP, apoyan fuertemente el hecho de que un porcentaje importante de nuestras células diferenciadas tiene un fenotipo de oligodendrocitos maduros (oligodendrocitos-*like*).

### *X.5 Expresión de marcadores a nivel de transcripción*

Además del cambio fenotípico, las células diferenciadas presentaron cambio en la expresión génica de los marcadores nestina, CNPasa y PDGFR- $\alpha$ . Cabe señalar, que tanto las células control (sin diferenciar) como las diferenciadas expresaron estos genes. Sin embargo, la expresión de nestina, CNPasa y PDGFR- $\alpha$  fue mayor en los oligodendrocitos-like que en las células no inducidas ( $p < 0.05$ ).

### *X.6 Ausencia de expresión de Olig2, NG2, O4 y MOG por los oligodendrocitos-like*

Los genes no expresados por nuestros cultivos inducidos a diferenciarse a oligodendrocitos fueron la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), Olig2, NG2 y O4. MOG es una proteína que se expresa en las células maduras mielinizantes. Por lo tanto, el no detectar su expresión, podría deberse al hecho de que nuestras células inducidas a diferenciarse no habían alcanzado la madurez necesaria [5]. Con respecto a los otros marcadores no detectados, varios autores han propuesto a Olig2 como un factor de transcripción necesario para la diferenciación a oligodendrocitos [56] [57]. Sin embargo, Zhou y Anderson [58] observaron que células Olig1/2+/- daban lugar a oligodendrocitos, mientras que aquellas Olig1/2-/- producían astrocitos. Esto indica que son necesarias complejas interacciones entre factores de transcripción para que se expresen las características de los oligodendrocitos maduros [58] y que la no expresión de este gen no impide la diferenciación a oligodendrocitos. Además, otros autores han indicado que Olig2 estimula, en ciertos sitios anatómicos, la expresión de PDGFR- $\alpha$  y en otros sitios no [59]. Por lo tanto, pudo no haber sido indispensable Olig1/2-/- para la diferenciación de nuestros oligodendrocitos-like.

Otros dos marcadores no expresados por nuestros cultivos de oligodendrocitos-like fueron NG2 y O4. Al respecto, Ebrahimi-Barough y cols. [36] comentan que ellos no detectaron la expresión de O4 en presencia de T3 y que sin embargo, cuando estos

investigadores utilizaron como inductor el microRNA miR-219, sí detectaron O4. Esos datos indican que T3 no estimula la expresión de O4; como lo hace miR-219 [36]—miR-219 regula precursores neurales de diferenciación inhibiendo a las proteínas PAR (partitioning-defective proteins) [60]. Por otro lado, las proteínas Par-defective están implicadas en el control de la división celular asimétrica. Con respecto a NG2, Sundberg y cols. [43] comentan que ellos detectaban expresión de NG2 sólo si incluían T3 en etapas tempranas de la diferenciación. Una situación similar observaron estos mismos autores con O4. Entonces, ellos concluyen que la no-expresión de NG2 o de O4 se debe a la falta de factores de crecimiento importantes como SHH, RA, T3 y AA; y que en protocolos de corta duración se requiere adicionar otros factores de crecimiento en el medio para una eficiente diferenciación [43]. Otro factor que pudo influir en los marcadores no expresados, es el tiempo de diferenciación. Esto debido a que la mayoría de los protocolos duran de 42 a 120 días, mientras que nosotros indujimos nuestros cultivos únicamente 9 días. Esto, aunado a que existen diferencias en el porcentaje de células que se diferencian a oligodendrocitos siguiendo un mismo protocolo [39]. Por lo tanto, cada tipo celular debe tener factores intracelulares que no les permiten expresar ciertos marcadores, pero que en otras estirpes celulares sí se expresan [61].

#### *X.7 Expresión de marcadores neurales por CMM*

Respecto a la expresión de marcadores neurales por las CMMH-TA, varios autores ya han reportado este hecho en CMM [62] [63] [53]. Específicamente el gen de nestina, lo han reportado expresado en CM de pulpa dental, CM de la papila apical [64], CMM de tejido adiposo [65] [40], CNPasa en CM de los dientes deciduos [64], CMM de tejido adiposo [53] y CMM fetales [41].

Algunos autores han planteado varias hipótesis tratando de explicar porque las CMM expresan genes neurales, Blondheim y Cols [62] comentan que podría implicar que el patrón de expresión génica de las CMM representa un fenotipo “multidiferenciado” es decir que las células ya poseen características neurales, otra hipótesis es que debido a que son multipotentes, las CMM expresan varios genes a un nivel bajo, no funcional. La expresión basal de genes de linaje neural le confiere a las células el potencial de diferenciarse oportunamente a dicho linaje, que de otra manera hubiera sido más difícil y tardado. La expresión de genes neurales sugiere que la plasticidad de las CMM es amplia y que se pueden diferenciar además de adipocitos y osteocitos a células de linaje neural [62]. Foudah y Cols. [63] sugieren que la expresión de marcadores neurales por las CMM puede ser una respuesta al estrés causado por el ambiente, cuando se les hace vivir *in vitro*. Una hipótesis alterna es que la expresión de genes de linaje neural por las CMM se debe a una desregulación del factor silenciador neuronal restrictivo (NRSF)—un factor transcripcional involucrado en la represión de genes específicos de neuronas en células no neuronales[63]—.

#### *X.8 Expresión génica por oligodendrocitos-like derivados de CMMH-TA cultivados en 3D y en cocultivo con neuronas*

Partiendo de la premisa de que el cultivo de células en dos dimensiones no reproduce la anatomía o fisiología de un tejido [45], así como ha sido reportado que se consigue una mejor diferenciación utilizando cultivos en 3D en vez de 2D, debido a que en 3D se propician mayores interacciones célula-célula [66]. De igual manera es importante la matriz extracelular para estimular la diferenciación y crecimiento celular [67]. Llevamos a cabo una parte de la diferenciación en Matrigel, con la finalidad de estimular una mejor diferenciación. Lo que observamos es que el cambio morfológico de CMMH-TA a oligodendrocitos-like [58] en nuestros cultivos fue más evidente en las células

inducidas a diferenciación y crecidas en Matrigel®, en comparación con los cultivos en monocapa. Respecto a la expresión de marcadores analizados no se consiguió una mejora en la expresión en comparación a los resultados en monocapa. No hay reportes en donde se haya llevado a cabo la diferenciación a oligodendrocitos en Matrigel. Sólo hay un reporte en el que Matrigel indujo a las células de Schwann a producir mielina [68]. Sin embargo, el tiempo de cultivo fue de semanas y no de días, como lo hicimos nosotros.

Con respecto al cocultivo, su importancia se ha señalado en protocolos de diferenciación en neuronas, ya que se ha visto que la adquisición de excitabilidad neuronal en células derivadas de CMM se obtiene gracias al cocultivo con células neurales adultas ya que estas células les brindan factores adicionales de diferenciación [69]. También se sabe que en los oligodendrocitos aumenta la expresión de genes de mielina en presencia de neuronas [5]. En estas condiciones, también se incrementa la comunicación entre oligodendrocitos y neuronas, que es esencial para la correcta mielinización [70]. El cocultivo desarrollado por nosotros favoreció el aumento del porcentaje de células positivas a MBP y PLP; sin embargo este aumento no fue significativo y tampoco se obtuvo mejora en la expresión de marcadores analizados por RT-PCR. Por lo tanto, bajo nuestras condiciones experimentales, tampoco se expresaron los marcadores ya comentados (MOG, Olig2, NG2 y O4).

#### *X.9 Interpretación de nuestros resultados en contexto con el conocimiento actual*

De acuerdo con todo lo anterior, los marcadores que nosotros no detectamos en nuestros cultivos pudieron no haberse expresado *in vitro* por las siguientes razones: 1) Que nuestras células no hayan alcanzado un estado de suficiente madurez; sin embargo, dado que nuestros oligodendrocitos-*like* sí expresaron MBP y PLP—proteínas típicas de oligodendrocitos maduros—es difícil que esta hipótesis se sostenga ante futuras evidencias. 2) Que la expresión de estas proteínas sea

dependiente de dosis mayores de T3 de las que nosotros utilizamos, o que se requiera un mayor tiempo de inducción para que se exprese la cadena de señalización completa para que se expresen los marcadores ausentes. 3) Que se haya requerido un tiempo mayor de contacto con las neuronas de ratón en nuestros cocultivos [71] [72]. Es sabido que se requiere el intercambio de citocinas entre cilindroes de las neuronas y oligodendrocitos y el contacto de sus membranas para que ocurra la mielinización [73]. Nosotros permitimos el contacto entre estas dos estirpes celulares durante sólo 8 días; 4) Nosotros no observamos la formación de cilindroes en nuestros cocultivos y posiblemente ese fue un factor determinante, si lo que es necesario para la expresión de ciertas proteínas de los oligodendrocitos es precisamente el contacto de estas células con los cilindroes. 5) Se requieren otros factores de diferenciación, además de los que nosotros utilizamos *in vitro*; que están presentes *in vivo* y que nosotros no incluimos en nuestro medio de diferenciación por no conocerlos. Una manera muy interesante para conservar o desechar esta hipótesis y que sería muy benéfica para nuestros propósitos de devolver la funcionalidad a la médula espinal en caso de LME es implantar nuestros oligodendrocitos-*like in vivo* y ver si estas células expresan los marcadores ausentes.

Finalmente que no se hayan obtenido el 100% de células maduras no es un problema debido a que las células precursoras alcanzan la madurez al ser implantadas [32], por lo cual para los fines de este proyecto que es producir oligodendrocitos que ayuden en la recuperación de LME, los resultados obtenidos son prometedores.

#### *X.10 Aportaciones al conocimiento de la diferenciación de CMMH-TA*

A pesar de no detectar expresión de Olig2, NG2 y O4 y MOG, la adopción de la forma típica de oligodendrocitos en 2D y en 3D y la expresión de MBP, PLP, nestina, CNPasa y PDGFR- $\alpha$  sugieren fuertemente que, mediante nuestro protocolo de diferenciación de CMMH-TA a oligodendrocitos, las CMMH-TA generan células del linaje



oligodendrocítico en diversos estadios de diferenciación: células progenitoras de oligodendrocitos (expresión de nestina, PDGFR- $\alpha$ ), preoligodendrocitos (expresión de PDGFR- $\alpha$ ), oligodendrocitos inmaduros (expresión de CNPasa) y oligodendrocitos maduros (expresión de MBP y PLP) [70] [5] [74] [34] [38].

Por todo lo anterior, queda claro que se requiere más de una señal y varios factores—algunos de ellos todavía desconocidos—para que se lleve a cabo totalmente el proceso de diferenciación de las CMM *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, es necesario seguir estudiando este proceso.

## **XI. CONCLUSIONES**

XI.1 Bajo el protocolo implementado, las CMMH-TA se diferenciaron *in vitro* a células parecidas a oligodendrocitos, lo cual apoya la hipótesis del presente proyecto.

XI.2 -Esta es la primera vez que se demuestra que CMMH-TA se diferencian *in vitro* a oligodendrocitos, usando T3 como inductor.

XI.3 El cultivo en Matrigel y cocultivo con neuronas no mejora la diferenciación ya que no altera la expresión de los marcadores analizados, bajo nuestras condiciones.

## **XII. PERSPECTIVAS**

XII.1 Utilizar las células diferenciadas en un modelo de LME en rata para estudiar *in vivo* su capacidad mielinizante, así como su efectividad en la terapia celular de LME.

XII.2 Desarrollar un modelo de cocultivo de neuronas y células diferenciadas a oligodendrocitos en nervio descelularizado *in vitro*, que nos permita estudiar la capacidad de las células parecidas a oligodendrocitos de mielinizar a neuronas así como repoblar un nervio descelularizado.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Nieuwenhuys, R., El sistema nervioso central humano 2009: Editorial Medica Panamericana SA de CV.
2. Cruz-Cruz, G.J.y.O.-G., M.G. , Estrategia para el tratamiento de lesiones por sección completa de médula espinal basada en implantes de polímeros sintetizados por plasma. 2010.
3. Emery, B., Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*, 2010. **330**(6005): p. 779-82.
4. Mekhail, M., Almazan, G. y Tabrizian, M., Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Prog Neurobiol*, 2012. **96**(3): p. 322-39.
5. Baumann, N.y.P.-D., D., Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 871-927.
6. He, L.y.L., Q. R., Coordinated control of oligodendrocyte development by extrinsic and intrinsic signaling cues. *Neurosci Bull*, 2013. **29**(2): p. 129-43.
7. Billon, N., Jolicoeur, C. y Raff, M., Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol*, 2006. **330**: p. 15-32.
8. Finzsch, M., Stolt, C. C., Lommes, P. y Wegner, M., Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development*, 2008. **135**(4): p. 637-46.
9. Girolamo, F., Strippoli, M., Errede, M., Benagiano, V., Roncali, L., Ambrosi, G. y Virgintino, D., Characterization of oligodendrocyte lineage precursor cells in the mouse cerebral cortex: a confocal microscopy approach to demyelinating diseases. *Italian Journal of Anatomy and Embriology*, 2010. **115**: p. 95-102.
10. Kaka, G.R., Tiraihi, T., Delshad, A., Arabkheradmand, J., Kazemi, H., In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. *Int J Neurosci*, 2012. **122**(5): p. 237-47.
11. Pérez, R., Martín del Campo, S., Renán, S., Durán Ortiz, S., Aspectos epidemiológicos de la lesión medular de la población del Centro Nacional de Rehabilitación. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 2008. **20** p. 74-82.
12. Thomas, K.E.y.M., L. D., Will stem cell therapies be safe and effective for treating spinal cord injuries? *Br Med Bull*, 2011. **98**: p. 127-42.
13. Vasiliadis, A.V., Epidemiology map of traumatic spinal cord injuries: A global overview. *Int J Caring Sci*, 2012. **5**: p. 335-47.
14. Karimi-Abdolrezaee, S.y.E., E., Stem cells and spinal cord injury repair. In *Regenerative Biology of the Spine and Spinal Cord* Springer New York., 2012: p. 53-73.
15. Sahni, V.y.K., J. A., Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat Rev Neurol*, 2010. **6**(7): p. 363-72.
16. Vasiliadis, A.V., Epidemiology map of traumatic spinal cord injuries: A global overview. *International Journal*, 2012. **5**(3): p. 335-347.
17. Sypecka, J., Searching for oligodendrocyte precursors for cell replacement therapies. *Acta Neurobiol Exp*, 2011. **71**: p. 94–102.
18. Ilic, D.y.P., J. M., Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull*, 2011. **98**: p. 117-26.
19. Peterson, J.y.P., P. J. , Regenerative medicine and the gut. *Gastroenterology* 2011. **141**(4): p. 1162-1166.
20. Amabile, G.y.M., A., Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(2): p. 59-68.
21. Christie, V.B.y.P., S.A., Stem Cell Growth and Differentiation The Use of Small Molecules. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 2011. **37**: p. 1-11.
22. Tollervey, J.R.y.L., V.V., Adult stem cells: simply a tool for regenerative medicine or an additional piece in the puzzle of human aging? *Cell Cycle*, 2011. **10**(24): p. 4173-4176.

23. Ronaghi, M., Erceg, S., Moreno-Manzano, V. y Stojkovic, M., Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells*, 2010. **28**(1): p. 93-9.
24. Terzic, A., Folmes, C. D., Martinez-Fernandez, A. y Behfar, A., Regenerative medicine: on the vanguard of health care. *Mayo Clin Proc*, 2011. **86**(7): p. 600-2.
25. Friedenstein, A.J., . Chailakhjan, R.K. y Lalykina, K.S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970. **3**(4): p. 393-403.
26. Glotzbach, J.P., Wong, V. W., Gurtner, G. C. y Longaker, M. T., Regenerative medicine. *Curr Probl Surg*, 2011. **48**(3): p. 148-212.
27. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O. y Michalek, J., Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem cells and development*, 2012. **21**(14): p. 2724-2752.
28. Bernal, A., Fernández, M., Pérez, L. M. , San Martín, N. y Gálvez, B.G. , Method for Obtaining Committed Adult Mesenchymal Precursors from Skin and Lung Tissue. *PLoS ONE* 2012. **7**(12).
29. Patel, D.M., Shah, J. y Srivastava, A. S., Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*, 2013. **2013**: p. 496218.
30. Ong, W.K.y.S., S., Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(6): p. 1083-6.
31. Lindroos, B., Suuronen, R. y Miettinen, S., The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2010. **7**(2): p. 269-291.
32. Czepiel, M., Balasubramanian, V., Schaafsma, W., Stancic, M., Mikkers, H., Huisman, C., Boddeke, E. y Copray, S., Differentiation of induced pluripotent stem cells into functional oligodendrocytes. *Glia*, 2011. **59**(6): p. 882-92.
33. Grade, S., Bernardino, L. y Malva, J. O., Oligodendrogenesis from neural stem cells: perspectives for remyelinating strategies. *Int J Dev Neurosci*, 2013. **31**(7): p. 692-700.
34. Fancy, S.P., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J., Rowitch, D. H., Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci*, 2011. **34**: p. 21-43.
35. Tetzlaff, W., Okon, E. B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C. E., Sparling, J. S., Plemel, J. R. y Kwon, B. K. , A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. . *Journal of neurotrauma*, 2011. **28**(8): p. 1611-1682.
36. Ebrahimi-Barough, S., Kouchesfehiani, H. M., Ai, J., Mahmoodinia, M.,Tavakol, S. y Massumi M., Programming of human endometrial-derived stromal cells (EnSCs) into pre-oligodendrocyte cells by overexpression of miR-219. *Neurosci Lett*, 2013. **537**: p. 65-70.
37. Abbaszadeh, H.A., Tiraihi, T., Delshad, A.R., Saghedi Zadeh, M. y Taheri, T., Bone Marrow Stromal Cell Transdifferentiation into Oligodendrocyte-Like Cells Using Triiodothyronine as a Inducer with Expression of Platelet-Derived Growth Factor  $\alpha$  as a Maturity Marker. *Iranian Biomedical Journal* 2013. **17** (2): p. 62-70.
38. Luo, Y.C., Zhang, H. T., Cheng, H. Y., Yang, Z. J., Dai, Y. W., Xu, R. X., Differentiation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived stromal cells into cells with an oligodendrocyte phenotype. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010. **46**(7): p. 585-9.
39. Tokumoto, Y., Ogawa, S., Nagamune, T. y Miyake, J., Comparison of efficiency of terminal differentiation of oligodendrocytes from induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells in vitro. *J Biosci Bioeng*, 2010. **109**(6): p. 622-8.
40. Franco-Lambert, A.P., Fraga-Zandonai, A., Bonatto, D., Cantarelli-Machado, D. y Pegas-Henriques, J. A., Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation*, 2009. **77**(3): p. 221-8.
41. Kennea, N.L., Waddington, S. N., Chan, J., O'Donoghue, K., Yeung, D.,Taylor, D.L., Al-Allaf, F.A., Pirianov, G., Themis, M., Edwards, A. D., Fisk, N. M. y Mehmet, H. , Differentiation of human fetal mesenchymal stem cells into cells with an oligodendrocyte phenotype. *Cell Cycle* 2009. **8**(7): p. 1069-1079.

42. Zhang, H.T., Fan, J., Cai, Y. Q., Zhao, S. J., Xue, S., Lin, J. H., Jiang, X. D. y Xu, R. X., Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation*, 2010. **79**(1): p. 15-20.
43. Sundberg, M., Hyysalo, A., Skottman, H., Shin, S., Vemuri, M., Suuronen, R., Narkilahti, S., A xeno-free culturing protocol for pluripotent stem cell-derived oligodendrocyte precursor cell production. *Regenerative medicine* 2011. **6**(4): p. 449-460.
44. Ebrahimi-Barough, S., Kouchesfahani, H. M., Ai, J., Massumi, M., Differentiation of human endometrial stromal cells into oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). *J Mol Neurosci*, 2013. **51**(2): p. 265-73.
45. Calvo-García, S., Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. 2013. **5**: p. 215-232.
46. Miki, Y., Ono, K., y Hata, S. , The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012. **131**(3-5): p. 68-75.
47. Hirota, S., Ohashi, A., Nishida, T., Isozaki, K., Kinoshita, K., Shinomura, Y., & Kitamura, Y., Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  gene in gastrointestinal stromal tumors. . *Gastroenterology*, 2003. **125**(3 ): p. 660-667.
48. Ruffini, F., Arbour, N., Blain, M., Olivier, A. y Antel, J. P., Distinctive Properties of Human Adult Brain-Derived Myelin Progenitor Cells. *American Journal of Pathology*, 2004. **165**(6): p. 2167-2175.
49. Bunnell, B.A., Flaas, M., Gagliardi, C., Patel, B. y Ripoll, C., Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 2008. **45**(2): p. 115-20.
50. Tewarie, R.S.N., Hurtado, A., Bartels, R. H., Grotenhuis, A., & Oudega, M., Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *The journal of spinal cord medicine*, 2009. **32**(2): p. 105-114.
51. Sensebe, L., Bourin, P. y Tarte, K., Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(1): p. 19-26.
52. Asmani, M.N., Ai, J., Amoabediny, G., Noroozi, A., Azami, M., Ebrahimi-Barough, S., Navaei-Nigjeh, M., Ai, A. y Jafarabadi, M., Three-dimensional culture of differentiated endometrial stromal cells to oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) in fibrin hydrogel. *Cell Biol Int*, 2013. **37**(12): p. 1340-9.
53. Jang, S., Cho, H. H., Cho, Y. B., Park, J. S. y Jeong, H. S., Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol*, 2010. **11**: p. 25.
54. Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K. y Steward, O., Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2005. **25**(19): p. 4694-705.
55. Tracy, E.T., Zhang, C. Y., Gentry, T., Shoulars, K. W. y Kurtzberg, J., Isolation and expansion of oligodendrocyte progenitor cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 2011. **13**(6): p. 722-9.
56. Zuchero, J.B.y.B., B. A., Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Curr Opin Neurobiol*, 2013. **23**(6): p. 914-20.
57. Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J. y Bruck, W., Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain*, 2008. **131**(Pt 7): p. 1749-58.
58. Rowitch, D.H., Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(5): p. 409-19.
59. Nicolay, D.J., Doucette, J. R. y Nazarali, A. J., Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia*, 2007. **55**(13): p. 1287-99.
60. Hudish, L.I., Blasky, A.J. y Appel, B., miR-219 Regulates Neural Precursor Differentiation by Direct Inhibition of Apical Par Polarity Proteins. *Developmental Cell*, 2013. **27**(4): p. 387-398.
61. Kang, S.K., Shin, M. J., Jung, J. S., Kim, Y. G., & Kim, C. H. , Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem cells and development*, 2006. **15**(4): p. 583-594.

62. Blondheim, N.R., Levy, Y.S., Ben-Zur, T., Burshtein, A., Cherlow, T., Kan. I., Barzilai, R., Bahat-Stromza, M., Barhum, Y., Bulvik, S., Melamed, E. y Offen, D., Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev*, 2006. **15**(2): p. 141-64.
63. Foudah, D., Redondo, J., Caldara, C., Carini, F., Tredici, G. y Miloso, M., Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cell Mol Biol Lett*, 2013. **18**(2): p. 163-86.
64. Huang, G.T., Gronthos, S. y Shi, S., Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 2009. **88**(9): p. 792-806.
65. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. y Hedrick, M.H., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
66. Cha, B.H., Kim, J.H., Kang, S.W., Do, H.J., Jang, J.W., Choi, Y.R., Park, H., Kim, B.S. y Lee, S.H., Cartilage tissue formation from dedifferentiated chondrocytes by codelivery of BMP-2 and SOX-9 genes encoding bicistronic vector. *Cell Transplant*, 2013. **22**(9): p. 1519-28.
67. Discher, D.E., Mooney, D.J. y Zandstra, P. W., Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 2009. **324**(5935): p. 1673-7.
68. Carey, D.J., Todd, M.S. y Rafferty, C.M., Schwann cell myelination: induction by exogenous basement membrane-like extracellular matrix. *J Cell Biol*, 1986. **102**(6): p. 2254-2263.
69. Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., Pizzolo, G., Sbarbati, A. y Bonetti, B., Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*, 2007. **40**(2): p. 382-90.
70. Barateiro, A.y.F., A., Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(9): p. 1917-29.
71. Rubio, N., Rodriguez, R. y Arevalo, M. A., In vitro myelination by oligodendrocyte precursor cells transfected with the neurotrophin-3 gene. *Glia*, 2004. **47**(1): p. 78-87.
72. Gingras, M., Beaulieu, M.M., Gagnon, V., Durham, H.D. y Berthod, F., In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model. *Glia*, 2008. **56**(3): p. 354-64.
73. Fruhbeis, C., Frohlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchhoff, F., Mobius, W., Goebbels, S., Nave, K. A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J. y Kramer-Albers, E. M., Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*, 2013. **11**(7): p. e1001604.
74. Kerr, C.L., Letzen, B. S., Hill, C. M., Agrawal, G., Thakor, N. V., Sternecker, J. L., Gearhart, J. D. y All, A. H., Efficient differentiation of human embryonic stem cells into oligodendrocyte progenitors for application in a rat contusion model of spinal cord injury. *Int J Neurosci*, 2010. **120**(4): p. 305-13.